

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

Función de *Gadd45g* en el sistema inmunológico y desarrollo embrionario

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura González Silva

Director

Jesús María Salvador Sánchez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

Función de *Gadd45g* en el sistema inmunológico y desarrollo embrionario

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura González Silva

Director

Jesús María Salvador Sánchez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



**FUNCIÓN DE *Gadd45g* EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO
Y DESARROLLO EMBRIONARIO**

TESIS DOCTORAL

LAURA GONZÁLEZ SILVA

Realizada en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) bajo la dirección
del doctor D. Jesús María Salvador Sánchez



Madrid, 2014

VºBº Director de tesis

Dr. Jesús María Salvador Sánchez

A mi familia

Índice

| | |
|--|---------------|
| ÍNDICE | 7 |
| ABREVIATURAS..... | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1. Sistema inmunitario..... | 15 |
| 1.1. La familia Gadd45. | 15 |
| 1.1.1. La familia Gadd45 en estrés y regulación del ciclo celular. | 15 |
| 1.1.2. La familia Gadd45 en inmunidad. | 17 |
| – Inmunidad innata..... | 18 |
| – Inmunidad adaptativa | 19 |
| – Autoinmunidad | 20 |
| 1.2. Gadd45g..... | 21 |
| 1.3. El sistema inmunitario..... | 23 |
| 1.3.1. Desarrollo de los linfocitos T..... | 24 |
| 1.3.2. Respuesta inmunitaria. | 26 |
| 1.3.3. Células Th1, Th2 y Th17 en la respuesta inmunitaria..... | 27 |
| – Th1 | 28 |
| – Th2 | 29 |
| – Th17 | 29 |
| – Treg..... | 30 |
| 2. Desarrollo embrionario..... | 31 |
| 2.1. La familia Gadd45 en el desarrollo embrionario. | 31 |
| 2.2. Determinación del sexo..... | 32 |
| 2.3. Desarrollo de la gónada en mamíferos. | 33 |
| 2.3.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada. | 34 |
| 2.3.2. Las células germinales primordiales. | 35 |
| 2.4. Diferenciación de los testículos..... | 36 |
| 2.4.1. Células de Sertoli..... | 36 |
| 2.4.2. Células de Leydig..... | 37 |
| 2.4.3. Formación de los cordones testiculares..... | 38 |
| 2.5. Diferenciación del ovario. | 38 |
| 2.6. Genes implicados en la determinación del sexo. | 40 |
| 2.6.1. Sry. | 40 |
| 2.6.2. Sox9..... | 43 |
| 2.6.3. Hormona anti-Mülleriana (AMH). | 45 |
| 2.7. Antagonismo entre la cascada de desarrollo masculina y la femenina..... | 45 |
| 2.8. El fondo genético en la determinación del sexo. | 48 |
| 2.9. Desórdenes del desarrollo sexual (DSD) | 49 |

| | |
|---|-----------|
| OBJETIVOS..... | 53 |
| 1. <i>Función de Gadd45g en el sistema inmunitario</i> | 55 |
| 2. <i>Papel de Gadd45g en el desarrollo embrionario</i> | 55 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 57 |
| 1. <i>Cepas de ratones.</i> | 59 |
| 1.1. Extracción de ADN y genotipado de los ratones. | 59 |
| 2. <i>Citometría de flujo.</i> | 61 |
| 2.1. Estudio del fenotipo inmunológico. | 61 |
| 2.2. Citometría de flujo de las células T reguladoras..... | 62 |
| 3. <i>Cultivos celulares y ensayos funcionales.</i> | 63 |
| 3.1. Obtención y cultivo de células T CD4+. | 63 |
| 3.2. Ensayos de proliferación. | 63 |
| 3.3. Ensayos de muerte celular. | 64 |
| 3.4. Diferenciación de células T CD4+ hacia Th1, Th2 y Th17 y ensayo de producción de citoquinas. 64 | |
| 3.5. Análisis de la activación de células Th1 y Th2. | 66 |
| 3.6. Activación <i>in vitro</i> de timocitos. | 66 |
| 4. <i>Preparación y análisis de proteínas por western blot (wb)</i> | 67 |
| 4.1. Preparación de extractos celulares totales. | 67 |
| 4.2. Análisis de proteínas por wb. | 67 |
| 5. <i>Obtención de embriones.</i> | 69 |
| 5.1. Obtención de las gónadas embrionarias. | 70 |
| 6. <i>Análisis histológico.</i> | 71 |
| 7. <i>Tinción de gónadas completas.</i> | 71 |
| 8. <i>Hibridación in situ de gónadas completas.</i> | 72 |
| 8.1. Generación de las sondas..... | 72 |
| 8.2. Hibridación <i>in situ</i> | 74 |
| 9. <i>PCR cuantitativa.</i> | 75 |
| 10. <i>Análisis estadístico.</i> | 75 |
| RESULTADOS | 77 |
| 1. <i>Gadd45g en el sistema inmunitario.</i> | 79 |
| 1.1. Caracterización de los ratones deficientes en <i>Gadd45g</i> | 79 |
| 1.2. Caracterización del fenotipo inmunológico. | 80 |
| 1.3. Caracterización de las poblaciones celulares tímicas..... | 86 |
| 1.4. Estudio de <i>Gadd45g</i> en la función de las células CD4. | 88 |
| 1.4.1. <i>Gadd45g</i> en la proliferación de células CD4+. | 88 |
| 1.4.2. Estudio de la implicación de <i>Gadd45g</i> en la muerte inducida por activación (AICD) en células T CD4+ | 89 |
| 1.5. Estudio de la función de <i>Gadd45g</i> en células Th1, Th2 y Th17. | 90 |

| | | |
|---|--|------------|
| 1.5.1. | <i>Gadd45g</i> es necesario para la función de las células Th1. | 90 |
| 1.5.2. | <i>Gadd45g</i> no es necesario para la función de las células Th2. | 92 |
| 1.5.3. | <i>Gadd45g</i> es necesario para la función de las células Th17. | 93 |
| 1.6. | <i>Gadd45g</i> en el desarrollo tímico de los LT. | 94 |
| 2. | <i>Gadd45g</i> en el desarrollo embrionario. | 97 |
| 2.1. | Reversión del sexo de ratones <i>Gadd45g</i> ^{-/-} XY. | 97 |
| 2.2. | Análisis de la distribución de los sexos en las colonias deficientes en <i>Gadd45a</i> , <i>Gadd45b</i> , <i>Gadd45g</i> y dobles deficientes. | 102 |
| 2.3. | Análisis de la expresión de <i>Gadd45a</i> , <i>Gadd45b</i> y <i>Gadd45g</i> en gónadas embrionarias. | 103 |
| 2.4. | Análisis de la expresión de <i>Gadd45g</i> en las gónadas embrionarias. | 105 |
| 2.5. | Análisis de marcadores tempranos de diferenciación testicular en ratones <i>Gadd45g</i> ^{+/+} y <i>Gadd45g</i> ^{-/-} de fondo genético C57BL/6. | 106 |
| 2.6. | <i>Gadd45g</i> es necesario para la expresión de SRY y el desarrollo de testículos. | 107 |
| DISCUSIÓN..... | | 109 |
| 1. | <i>Gadd45g</i> en el sistema inmunitario. | 111 |
| 2. | <i>Gadd45g</i> en el desarrollo embrionario. | 119 |
| CONCLUSIONES..... | | 125 |
| ANEXO..... | | 129 |
| GADD45G IS ESSENTIAL FOR PRIMARY SEX DETERMINATION, MALE FERTILITY AND TESTIS DEVELOPMENT | | 131 |
| SUMMARY | | 139 |
| GADD45G FUNCTION IN THE IMMUNE SYSTEM AND IN SEX DETERMINATION | | 141 |
| NOMENCLATURA | | 149 |
| AGRADECIMIENTOS | | 151 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | | 153 |



Abreviaturas

| | | | |
|-----------------|---|---------------|--|
| α CD3 | anti-CD3 | EAE | encefalomielitis autoinmune experimental |
| α CD28 | anti-CD28 | EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| ADN | ácido desoxirribonucleico | EGTA | ácido etilenglicotetraacético |
| AICD | muerte celular inducida por activación | ELISA | ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima |
| AMH | hormona anti-Mülleriana | ERK | quinasa regulada por señales extracelulares |
| APC | aloficocianina | FCS | suero fetal de ternera |
| APCs | células presentadoras de antígeno | Fgf9 | gen 9 del factor de crecimiento de fibroblastos |
| ARN | ácido ribonucleico | Fgfr9 | receptor de Fgf9 |
| BL6 | cepa de ratón C57BL/6 | FISH | hibridación <i>in situ</i> fluorescente |
| BSA | albúmina de suero bovino | FITC | isotiocianato de fluoresceína |
| Cbln4 | cerebelina 4 | Fog2 | gen de la proteína amiga de Gata 2 |
| Cbx2 | homólogo de <i>chromobox 2</i> | Foxl2 | <i>forkhead box l2</i> |
| CD | conjunto de diferenciación | Foxp3 | <i>forkhead box p3</i> |
| Cdk1 | quinasa dependiente de ciclina 1 | Gadd45 | <i>growth arrest and DNA damage inducible protein 45</i> |
| CFSE | succinimidil éster de carboxifluoresceín diacetato | Gata4 | proteína 4 de unión a Gata |
| CM | conducto de Müller | HCl | ácido clorhídrico |
| CO ₂ | dióxido de carbono | HMG | grupo de alta movilidad |
| ConA | concanavalina A | HRP | peroxidasa de rábano |
| c.p.m. | cuentas por minuto | IFN γ | interferón gamma |
| CR6 | gen 6 de respuesta a citoquinas | Igf1r | receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 |
| CW | conducto de Wolff | IL | interleuquina |
| Dax1 | gen 1 de la región crítica del cromosoma X en DSS-ACH | Imp β 1 | importina β 1 |
| DIG | digoxigenina | IR | radiación ionizante |
| Dmrt1 | <i>doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i> | Ir | receptor de insulina |
| DN | dobles negativas CD4-CD8- | Irr | receptor relacionado con el receptor de insulina |
| DNR | daunorubicina | ITAM | motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosinas |
| DP | dobles positivas CD4+CD8+ | | |
| dpc | días <i>post coitum</i> | | |
| DSD | desorden del desarrollo sexual | | |

| | | | |
|---------------|--|--------------|---|
| JNK | quinasa N-terminal de c-Jun | PMA | 12-miristato 13-acetato forbol |
| kDa | kiloDalton | pMHC | péptido unido a MHC |
| Lck | proteína tirosina quinasa específica de leucocitos | PVDF | fluoruro de polivinilideno |
| LF α | linfotóxina α | SDS | dodecilsulfato sódico |
| LPS | lipopolisacárido | Sf1 | factor esteroidogénico 1 |
| LT | linfocito T | SG | surco genital |
| MAPK | proteína quinasa activada por mitógenos | Sox9 | SRY-box9 |
| MFI | intensidad media de fluorescencia | SP | simples positivas CD4+ o CD8+ |
| MHC | complejo mayor de histocompatibilidad | Sry | <i>sex-determining region on the Y chromosome</i> |
| min | minutos | TAE | tampón Tris/Acetato/EDTA |
| MKK | quinasa de MAPK | TBS | tampón Tris salino |
| MMS | metil metanosulfonato | TBS/t | tampón Tris salino con Tween20 |
| n | número de muestras | TCR | receptor de células T |
| NaCl | cloruro de sodio | TDF | factor de determinación testicular |
| NER | reparación por escisión de nucleótidos | TES | <i>testis specific enhancer of Sox9</i> |
| NFAT | factor de nuclear de células T activadas | TESCO | <i>testis specific enhancer of Sox9 core</i> |
| NF κ B | factor nuclear κ B | TGF β | factor de crecimiento tumoral β |
| NK | célula natural killer | Th1 | linfocito T helper 1 |
| NKT | célula natural killer T | Th2 | linfocito T helper 2 |
| NTMT | tampón fosfato alcalino | TM | túbulo mesonéfrico |
| OIG | gen inducible por oncostatina | TNF α | factor de necrosis tumoral α |
| PBS | tampón fosfato salino | Treg | linfocito T regulador |
| PBT | tampón fosfato salino con detergente Tween20 | UV | radiación ultravioleta |
| PCNA | antígeno nuclear de células en proliferación | wb | western blot |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa | Wnt4 | <i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i> |
| PE | ficoeritrina | wt | tipo silvestre (control) |
| PerCP | clorofila peridina | Wt1 | gen 1 supresor del tumor de Wilms |
| PFA | paraformaldehído | Zap70 | proteína de 70 kDa asociada a la cadena ζ |
| PGC | célula germinal primordial | | |
| PM | células peritubulares mioideas | | |



Introducción



1. Sistema inmunitario.

1.1. La familia Gadd45.

La familia de proteínas inducibles por daño en el ADN y parada de crecimiento-45 (Gadd45) está formada por tres miembros: *Gadd45a* (Gadd45 α /Gadd45), *Gadd45b* (Gadd45 β /MyD118) y *Gadd45g* (Gadd45 γ /CR6). EL gen *Gadd45a* se describió como un gen de inducción rápida en respuesta a la radiación ultravioleta (UV) en células del ovario de hámster chino (Fornace et al. 1989). *Gadd45b* fue clonado como un gen de respuesta primaria en la diferenciación de células mieloides (Abdollahi et al. 1991). Finalmente, *Gadd45g* se encontró en ratón como el gen ortólogo al gen humano CR6 que codifica para una proteína de respuesta aguda tras estimulación con IL-2.

Las proteínas de la familia Gadd45 son relativamente pequeñas (18 kDa), ácidas (pH 4.0-4.2), con una gran similitud entre ellas (55-57% de identidad en la secuencia aminoacídica); y, localización tanto citoplasmática como nuclear (Zhang et al. 1999) (Vairapandi et al. 2002). Las proteínas Gadd45 son capaces de formar homo- y heterodímeros con otros miembros de la familia Gadd45, así como oligómeros, aunque con menor frecuencia (Kovalsky et al. 2001) (Schrag et al. 2008). Cada uno de los genes que componen la familia Gadd45 se expresa en múltiples tejidos en mamíferos, que incluyen corazón, cerebro, bazo, pulmones, hígado, músculo esquelético, riñones y testículos (Zhang et al. 1999). *Gadd45g* se expresa abundantemente en la placenta. Las proteínas de la familia Gadd45 reúnen las características típicas de las proteínas implicadas en señalización: son pequeñas, tienen una rápida regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y desempeñan una gran variedad de funciones. Generalmente las proteínas de la familia Gadd45 participan la señalización por estrés y la regulación del ciclo celular (revisado en (Salvador et al. 2013)).

1.1.1. La familia Gadd45 en estrés y regulación del ciclo celular.

La expresión de las proteínas Gadd45 se induce en respuesta a diferentes tipos de estrés, fisiológicos y medioambientales, incluyendo radiación ionizante (IR), radiación UV, mutágenos como el metil metanosulfonato (MMS), medicamentos utilizados en quimioterapia, por ejemplo, el fosfato de etopósido (VP-16) o daunorubicina (DNR) y

citoquinas inflamatorias (Liebermann et al. 1998) (Gupta et al. 2005) (Gupta et al. 2006) (Gupta et al. 2006). En todos los casos, el patrón de expresión de cada gen de la familia Gadd45 es único, consistente con la diferente participación de los miembros en cada tipo de estrés.

Aunque los miembros de la familia Gadd45 tienen mucho en común, existen diferencias en su regulación y función. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la diversidad de factores de transcripción implicados, estructura tridimensional (Sanchez et al. 2008) (Schrag et al. 2008) y a sus interacciones con otras proteínas.

Existen evidencias de que la interacción de las proteínas GADD45 con el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) promueve la reparación por escisión de nucleótidos (NER) del ADN (Smith et al. 1994) (Vairapandi et al. 2000) (Azam et al. 2001) (Hoffman et al. 2007). La interacción con CDK1 inhibe la actividad quinasa del complejo cdc2/ciclinaB1 que juega un papel en la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular (Wang et al. 1999) (Vairapandi et al. 2002). GADD45a puede desplazar a PCNA del complejo ciclina D1, inhibiendo la replicación de ADN durante la fase S de la replicación (Smith et al. 1994). Se ha sugerido que cuando GADD45a interacciona con p21 se aumenta la actividad CDK1 dependiente de p21, promoviendo el arresto en G1 (Fan et al. 1999) (Liebermann et al. 2007) (Salvador et al. 2005). Los tres miembros de la familia Gadd45 se unen al extremo amino-terminal de MEKK4 lo que provoca su activación (Miyake et al. 2007) (Chi et al. 2004). Ésta, a su vez, activa la señalización a través de p38 y JNK, induciendo una fuerte respuesta apoptótica (Takekawa et al. 1998) (Mita et al. 2002). Además, la expresión de GADD45a es necesaria para el sostenimiento de la señalización de p38 y JNK, provocando el bloqueo del ciclo celular o apoptosis en queratinocitos irradiados con UV (Hildesheim et al. 2002) (Figura I1).

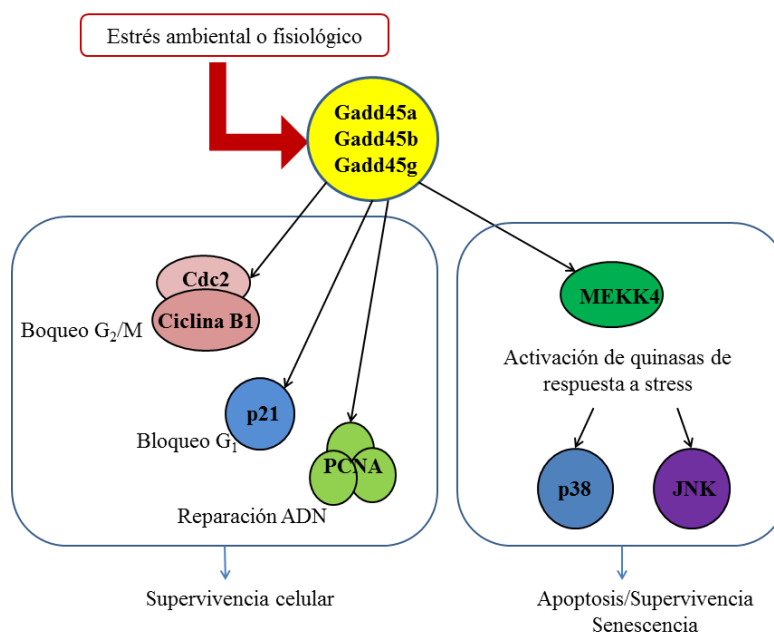


Figura I1. Interacciones y funciones comunes de las proteínas de la familia Gadd45. A través de la interacción con proteínas del ciclo celular, como el complejo Cdc2/Ciclina B1, p21 y PCNA, las proteínas Gadd45 bloquean el ciclo en distintos estados; esto permite la reparación del daño en el ADN. Además, interactúan con la quinasa MEKK4, activando la ruta de p38 y JNK, implicada en proliferación y apoptosis. También, pueden interaccionar directamente con otras proteínas de las vía de las MAPKs como MKK7 y p38 directamente. Figura adaptada de (Liebermann et al. 2008).

1.1.2. La familia Gadd45 en inmunidad.

El sistema inmunitario está formado por una gran variedad de tipos celulares que se encuentran distribuidos por todo el organismo. Esto hace necesario el establecimiento de una comunicación entre ellas, que puede ser por comunicación directa estableciéndose interacciones célula-célula o a través de citoquinas que permiten la comunicación a larga distancia. Dentro de las células, estas señales son procesadas por complejas redes que las transmiten e integran. Formando parte de estas redes de proteínas se encuentran las proteínas de la familia Gadd45 (revisado en (Schmitz 2013)).

Las proteínas de la familia Gadd45 se expresan en las células de sistema inmunitario en respuesta a distintos estímulos. Dentro de la inmunidad innata, se han descrito varias citoquinas inductoras de la expresión de las proteínas de la familia Gadd45 en células hematopoyéticas y del sistema inmunitario. Por ejemplo, hematopoyetinas como el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), M-CSF, G-CSF e interleuquina 3 (IL-3) inducen la expresión de todos los miembros de la familia

Gadd45 a nivel de ARN en células de médula ósea (Gupta et al. 2006). En células de médula ósea la deficiencia en *Gadd45a* o *Gadd45b* produce que estas células sean más sensibles a la apoptosis inducida por estrés (Gupta et al. 2006) (Gupta et al. 2005). La IL-6, citoquina implicada en la diferenciación de células hematopoyéticas y con actividad pro-inflamatoria, induce *Gadd45b* en la línea celular mielomonocítica murina M1 (Zhan et al. 1994). La citoquina IL-18 induce la expresión de *Gadd45b* y *Gadd45g* en células T helper (Arend et al. 2008). El tratamiento conjunto con IL-12 aumenta el efecto en este tipo celular (Yang et al. 2001). Cabe destacar que *Gadd45a* no se induce con IL-12 e IL-18. La citoquina IL-33 en conjunto con IL-12 induce la expresión de *Gadd45b* en célula T CD8 citotóxicas (Yang et al. 2011). Estos datos parecen indicar que las citoquinas pro-inflamatorias son las inductoras cruciales de la expresión de los genes Gadd45 en células hematopoyéticas. También, se ha observado que el tratamiento *in vivo* de ratones con LPS induce la expresión de *Gadd45b* (Zhang et al. 2005).

La estimulación del TCR también induce la expresión de los genes Gadd45. La estimulación de células CD4 *naïve* con anticuerpos anti-CD3 (que estimula el complejo del TCR) conduce a la expresión de *Gadd45b* a tiempos cortos de hasta 4 horas, viéndose incrementado este efecto con coestimulación con anti-CD28 (Lu et al. 2004). Usando un modelo de ratón transgénico se observó la expresión temprana de *Gadd45b* en timocitos (Schmitz et al. 2003). Sin embargo, la expresión de *Gadd45g* requiere la estimulación durante 48-96 horas (Lu et al. 2001). Esto puede deberse a que es la producción de IL-2 la que induce *Gadd45g* más que la señalización del TCR (Hoffmeyer et al. 2001).

– Inmunidad innata.

La función de las proteínas de la familia Gadd45 ha sido estudiada en mayor profundidad en células mieloides como granulocitos y macrófagos dentro del sistema inmunitario innato. Por ejemplo, en ausencia de *Gadd45a* o *Gadd45b*, la diferenciación *in vitro* de células de médula ósea a los linajes de granulocitos o macrófagos resulta en una menor frecuencia de los mismos (Gupta et al. 2005). La menor frecuencia de estas células se atribuyó a una mayor apoptosis durante la diferenciación de las mismas. Sin embargo, *Gadd45g* no es necesario para la diferenciación mieloide (Hoffmeyer et al. 2001). La deficiencia en *Gadd45a* y *Gadd45b*, además, provoca una mayor proliferación de las

células mieloides inmaduras (Gupta et al. 2006). Estos datos podrían indicar que las proteínas Gadd45 favorecen la diferenciación terminal de las células mieloides, así como inhibición de la proliferación celular una vez que se han diferenciado.

Además de en la diferenciación mieloide, *Gadd45a* y *Gadd45b* parecen ser necesarios para la función de granulocitos y macrófagos. Por ejemplo, en un modelo murino de sepsis experimental, los ratones deficientes en *Gadd45a* y *Gadd45b* presentan un fallo en el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal tras ser inyectados con LPS (Salerno et al. 2012). En este mismo estudio, se observó *in vitro* que la función de los granulocitos y macrófagos estaba afectada. En ensayos de quimiotaxis presentaban una migración menos eficiente, producían menos especies reactivas de oxígeno (ROS) y menos citoquinas. Además, la capacidad fagocítica de los macrófagos deficientes estaba gravemente afectada. Este efecto se atribuyó al efecto de GADD45a y GADD45b en la cascada de señalización de p38 y JNK.

– Inmunidad adaptativa

La relevancia de la familia Gadd45 ha sido estudiada en lo relativo a la inmunidad adaptativa, sobre todo centrándose en células T, aunque también se ha descrito su relevancia en células B, NKTs y células dendríticas. Por ejemplo, se ha observado que *Gadd45b* se induce fuertemente en células B tras activación a través de CD40 (Zazzeroni et al. 2003).

Las células NKTs son un tipo de linfocito que comparte características de las células NK y los linfocitos T de memoria. Las células NKTs son más resistentes a la muerte inducida por activación que las células T convencionales. Las NKTs expresan *Gadd45b* (Harada et al. 2004), lo que se correlaciona con su mayor resistencia a la apoptosis, puesto que *Gadd45b* ha sido caracterizada como una molécula anti-apoptótica en células mieloides (Gupta et al. 2005).

Las células dendríticas son las células presentadoras profesionales más importantes. Estas células capturan antígenos del ambiente y los presentan vía MHC de clase II a células Th CD4. Dependiendo del conjunto de citoquinas que las células dendríticas expresan, la respuesta inmunitaria será dirigida a un tipo determinado (Murphy et al. 2002). Las células dendríticas derivadas de la médula ósea expresan todos los miembros de la

familia *Gadd45* (Jirmanova et al. 2007). Así, se observa que las células dendríticas deficientes en *Gadd45a* de ratón presentan, tras activación con antígenos solubles de *Toxoplasma gondii*, una menor activación de la vía clásica MKK3/6-p38, menor producción de las citoquinas Th1 IL-2 e IFN γ , y una mayor expresión de la molécula coestimuladora CD40 (Jirmanova et al. 2007). De manera similar, las células dendríticas deficientes en *Gadd45b* producen menos IFN γ en respuesta a estimulación con LPS (Lu et al. 2004).

Se ha observado que *Gadd45g* desempeña un papel importante en la respuesta Th1, puesto que se ha observado su relevancia en la producción de IFN γ (Lu et al. 2001). Sin embargo, las células Th2 no se ven afectadas. *Gadd45b* también es necesario en la respuesta Th1. Se observó que en células T que sobreexpresaban *Gadd45b*, se promovía la producción de IFN γ tras la activación a través del TCR o la estimulación con IL-12 e IL-18 (Lu et al. 2004) (Yang et al. 2001). Se observó que este efecto estaba mediado por la activación prolongada de p38. La introducción de un dominante negativo de MEKK4 inhibe el efecto de la sobreexpresión de *Gadd45b* (Yang et al. 2001). Esto se correlaciona con que las células deficientes en MEKK4 secretan menos IFN γ durante la diferenciación Th1 y presentan una menor activación de p38 tras estimulación del TCR o con IL-12 e IL-18 (Chi et al. 2004). La sobreexpresión de *Gadd45b* o *Gadd45g* en células deficientes en MEKK4 no aumenta la expresión de IFN γ , como si ocurre en células wt. Esto indica que MEKK4 y las proteínas *Gadd45* forman parte de una cascada que potencia la producción de IFN γ y por tanto la respuesta Th1 (Chi et al. 2004).

– Autoinmunidad

En relación a las enfermedades con las que los miembros de la familia *Gadd45* están relacionados, cabe destacar su función en las enfermedades autoinmunes.

En ratones deficientes en *Gadd45a* se observa una activación constitutiva de la MAPK p38 (Salvador et al. 2005), que podría conducir a una activación inadecuada de las células T. Debido a esto, los ratones deficientes en *Gadd45a* desarrollan una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de autoanticuerpos contra ADN de doble cadena y de cadena sencilla, así como contra histonas (Salvador et al. 2002). Estos ratones presentan proteinuria y glomerulonefritis. Además, tienen niveles reducidos de leucocitos y linfocitos en sangre periférica. El cruce de ratones deficientes en *Gadd45a* con ratones en los que la tirosina en posición 323 (Tyr323) de la p38 ha

sido sustituida por fenilalanina (Phe) (Jirmanova et al. 2011) revierte el fenotipo presente en los ratones deficientes. Esto indica que la regulación de la activación alternativa de p38 por GADD45a es clave en la activación de las células T.

Gadd45b y *Gadd45g* han sido relacionados con enfermedades autoinmunes. Los ratones deficientes en *Gadd45b* muestran una respuesta más prolongada y exacerbada a la EAE (Liu et al. 2005). *In vivo*, las células T deficientes en *Gadd45b* proliferan más que las wt y son más resistentes a la inducción de apoptosis. También, se ha observado una menor expresión de *Gadd45b* en los fibroblastos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Svensson et al. 2009). Otro dato que apunta a la función de las proteínas Gadd45 en autoinmunidad, es el hecho de que los ratones con doble deficiencia en *Gadd45b* y *Gadd45g* desarrollan una enfermedad linfoproliferativa y esplenomegalia de manera espontánea (Liu et al. 2005).

1.2. *Gadd45g*.

Gadd45g fue denominado inicialmente como GRP17 (Suzuki et al. 1999) y se describió por primera vez como un gen de respuesta inmediata a IL-2 en células T humanas (Beadling et al. 1993). Después, también, fue identificado como un gen inducible por oncostatina M (OIG37) en células de hemangioblastoma murino (Nakayama et al. 1999), y como gen inducible por la eliminación del factor neurotrópico PC12 en células neuronales (Kojima et al. 1999). Como ya se ha comentado, se expresa en placenta, corazón, hígado, músculo esquelético, próstata, testículos y ovarios y se localiza en el cromosoma 9q22.1-q22 (Suzuki et al. 1999). Estructuralmente se ha caracterizado como parte de la familia de proteínas ribosomales L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 (Schrag et al. 2008). Se ha descrito que la homodimerización de GADD45g es necesaria para su función. Esta interacción se realiza a través de dos hélices α , que están muy conservadas evolutivamente. Además, en insectos solo se ha descrito un gen *Gadd45* que es similar a *Gadd45g*, lo que puede indicar que éste es el gen ancestral.

Las funciones de *Gadd45g* son variadas. Se ha descrito la función de *Gadd45g* en células del sistema inmunitario: los ratones deficientes en *Gadd45g* tienen un defecto en las células Th1. En estos ratones, las células Th1 tienen menor apoptosis, menor producción de IFN γ y la activación de p38 y JNK está reducida (Lu et al. 2001). Bajo estas

condiciones, estos ratones tienen una respuesta disminuida a la hipersensibilidad por contacto. En otro estudio, se describió que *Gadd45g* regula la producción de TNF α e IL6 en monocitos humanos activados con LPS (Shin et al. 2012). La deficiencia de *Gadd45g* junto con la deficiencia en *Gadd45b* produce un desorden linfoproliferativo con la rotura de la tolerancia a autoantígenos (Liu et al. 2005). Esto indica la importancia de *Gadd45g* en la generación de la respuesta Th1 y en la finalización de la misma. Sin embargo, existen discrepancias en la función de *Gadd45g* en este tipo de respuesta.

En algunos estudios parece que *Gadd45g* no tiene efecto alguno sobre el sistema inmunitario; así, en un estudio en el que se cultivan linfocitos deficientes en *Gadd45g* sin polarizar mantenidos con IL2, no parece haber defectos ni en la proliferación, ni en la muerte inducida por activación (AICD), ni en la activación de p38 o JNK, en comparación con ratones wt, cultivados en las mismas condiciones (Hoffmeyer et al. 2001). Otro estudio describe que *Gadd45g* no es necesario en la respuesta a estrés en fibroblastos embrionarios, siendo la activación de p38 y JNK independiente de la expresión de *Gadd45g* (Wang et al. 1999). La función de *Gadd45g* varía según el tejido o el tipo celular que se estudie, lo que complica la comprensión de sus funciones y regulación.

Recientemente, se ha descrito la función de *Gadd45g* en la diferenciación de células hematopoyéticas (Thalheimer et al. 2014). En este estudio *Gadd45g* se presenta como el enlace entre la señalización de citoquinas promotoras de la diferenciación y la diferenciación de células madre hematopoyéticas. Esta nueva función apoya la importancia de *Gadd45g* como supresor de tumores, puesto que se encuentra reprimido en muchos tumores y su recuperación podría permitir revertir las células tumorales a un fenotipo menos maligno. Se ha descrito la disrupción de la expresión de *Gadd45g*, por metilación de su promotor, en varios tipos de tumores como tumor de tiroides anaplásico (Chung et al. 2003), adenoma de pituitaria (Zhang et al. 2002) o cáncer de próstata (Flores et al. 2010), entre muchos otros (Ying et al. 2005) (Zhang et al. 2010). En estos tumores, *Gadd45g* bloquea la progresión del ciclo gracias a su unión con proteínas como p21 e induce apoptosis activando la cascada de p38 y c-Jun. Además, *Gadd45g* ha sido descrito como un gen importante en la respuesta adaptativa a tumores. Se realizaron experimentos de inyección de células de una línea de melanoma (B16) en

ratones, los cuales habían sido vacunados previamente frente a esta misma línea. Los ratones wt no desarrollaban tumores tras el tratamiento; sin embargo, un 70% de los ratones deficientes simultáneamente para *Gadd45b* y *Gadd45g* desarrollan tumores (Ju et al. 2009). También, se ha descrito su implicación en la diferenciación neuronal en *Xenopus* (Kaufmann et al. 2011), y es una diana directa de *Ascl1*, que es un factor de transcripción clave en la programación genética responsable de la diferenciación neuronal (Huang et al. 2010). Además, *Gadd45g* ha sido relacionado con la evolución del cerebro humano tras observarse que la pérdida de un elemento regulador de la expresión de *Gadd45g* podría haber propiciado el crecimiento del mismo y permitir la evolución humana. Este elemento perdido constituye una diferencia clave entre los primates superiores y los humanos (McLean et al. 2011).

Finalmente, *Gadd45g* está implicado en procesos de demetilación del ADN. Se ha observado que la familia *Gadd45* forma parte de un complejo junto a una deaminasa y una glicosilasa implicadas en procesos de demetilación en el pez cebra, *Danio rerio* (Rai et al. 2008). Esta función de demetilación podría estar asociada a la capacidad de la familia *Gadd45* de participar en los procesos de reparación de ADN y, en el caso de *Gadd45g*, además, podría estar vinculado a su capacidad para unirse directamente al ARN o ADN como se deduce de la familia de proteínas ribosomales a la que pertenece (Dengke K. Ma 2009).

Teniendo en cuenta lo mencionado y las controversias descritas, es importante estudiar en mayor profundidad y extensivamente el papel de *Gadd45g* en el sistema inmunitario así como en su posible implicación en la vigilancia de tumores y en la supresión de tumores.

1.3. El sistema inmunitario.

El sistema inmunitario defiende al hospedador de agentes infecciosos como virus, parásitos, bacterias y hongos. La inmunidad innata sirve como primera línea de defensa pero carece de la capacidad para reconocer determinados patógenos y para generar la inmunidad específica que permite prevenir la reinfección. La inmunidad adaptativa se basa en la selección clonal de un repertorio de linfocitos que llevan en su superficie receptores específicos con una gran diversidad en su especificidad que

permite al sistema inmunitario reconocer cualquier antígeno foráneo. En la respuesta inmunitaria adaptativa, linfocitos específicos del antígeno proliferan y se diferencian a células efectoras capaces de eliminar el patógeno.

El sistema de defensa del hospedador requiere distintos sistemas de reconocimiento y una gran variedad de mecanismos efectores para encontrar y destruir la gran diversidad de patógenos en sus hábitats dentro del cuerpo y en su superficie. La inmunidad adaptativa, no solo es capaz de eliminar el patógeno, además, es capaz de generar un gran número de linfocitos de memoria diferenciados a través de la selección clonal. Esto conduce a una respuesta más rápida y efectiva a la reinfección. La regulación de la respuesta inmunitaria, bien para suprimirla cuando no es necesaria, o bien para estimularla en la prevención de enfermedades infecciosas, es un proceso muy importante que permite al sistema inmunitario eliminar los patógenos evitando una reacción contra el propio hospedador.

1.3.1. Desarrollo de los linfocitos T.

La médula ósea suministra un aporte constante de progenitores linfoides que permiten el desarrollo de linfocitos T (LT) en el timo. Las subpoblaciones de linfocitos que se generan en el timo son linfocitos T $\alpha\beta$, CD8 o CD4, linfocitos T $\gamma\delta$, células NKT y células T reguladoras. En el timo, los LT pasan por una serie de etapas que permiten la generación de un amplio repertorio de receptores de reconocimiento de antígeno de células T (TCR) y aseguran la tolerancia de estos contra el propio organismo. Además, en el timo, también se generan los LT reguladores naturales que permiten controlar la respuesta inmunitaria en la periferia.

Los precursores tímicos llegan a la zona subcapsular, situada en la zona más superficial del timo. En este momento no expresan ningún correceptor y son llamados células dobles negativas (DN). Esta fase se subdivide en cuatro (DN1-4) en función de la expresión, entre otros, de los marcadores CD44 y CD25. Las células DN1 (CD44+, CD25-) proliferan y dan lugar a las células DN2 (CD44+, CD25+), sobre esta población comienza la reorganización de las cadenas γ , δ y β del TCR. De esta población surgen los LT $\gamma\delta$, que tienen funciones importantes en la defensa de la piel y las mucosas. Las células que consiguen reorganizar correctamente la cadena β pasan al estado DN3

(CD44-, CD25+) en el que también expresan una cadena pre- α formando el pre-TCR. Este pre-TCR es capaz de señalizar independientemente de antígeno. Esto permite realizar un punto de control sobre los linfocitos conocido como selección β , de modo que solo aquellas células que hayan reordenado correctamente la cadena β y son capaces de transmitir la señal a través del pre-TCR continúan desarrollándose dando lugar a las células DN4 (CD44-, CD25-). Estas células pasan a ser dobles positivas (DP) pasando por una fase intermedia como ISP (células inmaduras simples positivas). Estas células DP presentan en su superficie un TCR funcional y correceptores CD4 y CD8 y pasan por otro proceso de control (Figura 12).

Para que una célula DP pase a ser simple positiva (SP), debe reconocer un péptido unido al llamado complejo mayor de histocompatibilidad (pMHC) de clase I o II. El 90% de las células incapaces de unirse correctamente a un pMHC mueren por falta de estimulación, proceso conocido como muerte por negligencia. Las células que son capaces de unirse al pMHC correctamente y con una intensidad de señal moderada son seleccionados positivamente y pasan a ser células SP, CD4+ o CD8+ (Figura 12). Las células cuyo TCR tiene demasiada afinidad por el pMHC son eliminadas por selección negativa (de este modo se eliminan las células autorreactivas). Durante la fase de DP también se da lugar a las células reguladoras naturales que expresan el gen Foxp3 y se encargan de la regulación de la respuesta periférica de linfocitos autorreactivos que hayan podido escapar a la selección tímica (Ashton-Rickardt et al. 1994) (Eichmann 1995) (Klein et al. 2009) (Carpenter et al. 2010).

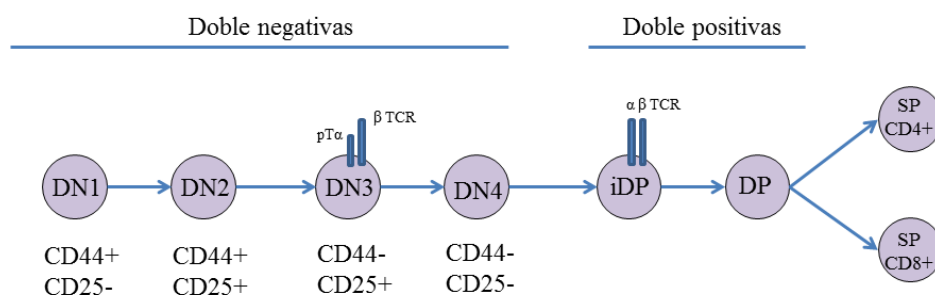


Figura 12. Desarrollo de linfocitos en el timo. Los linfocitos DN pasan por varias fases en las que expresan diferentes marcadores de superficie. En el paso de DN3 a DN4 se produce la selección de la cadena beta del TCR. Cuando pasan a ser DP ya tienen un TCR con las dos cadenas que lo componen y sobre esta población tiene lugar la selección tímica (modificado de (Miosge et al. 2005).

1.3.2. Respuesta inmunitaria.

Una vez que el linfocito T se ha desarrollado correctamente en el timo, pasa a la periferia donde circula continuamente por los distintos órganos linfáticos secundarios hasta que su TCR reconoce un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno (APC) mediante el MHC de clase I o II. Esta unión provoca la activación del linfocito T a través del TCR (Figura I3) (Appleman et al. 2003).

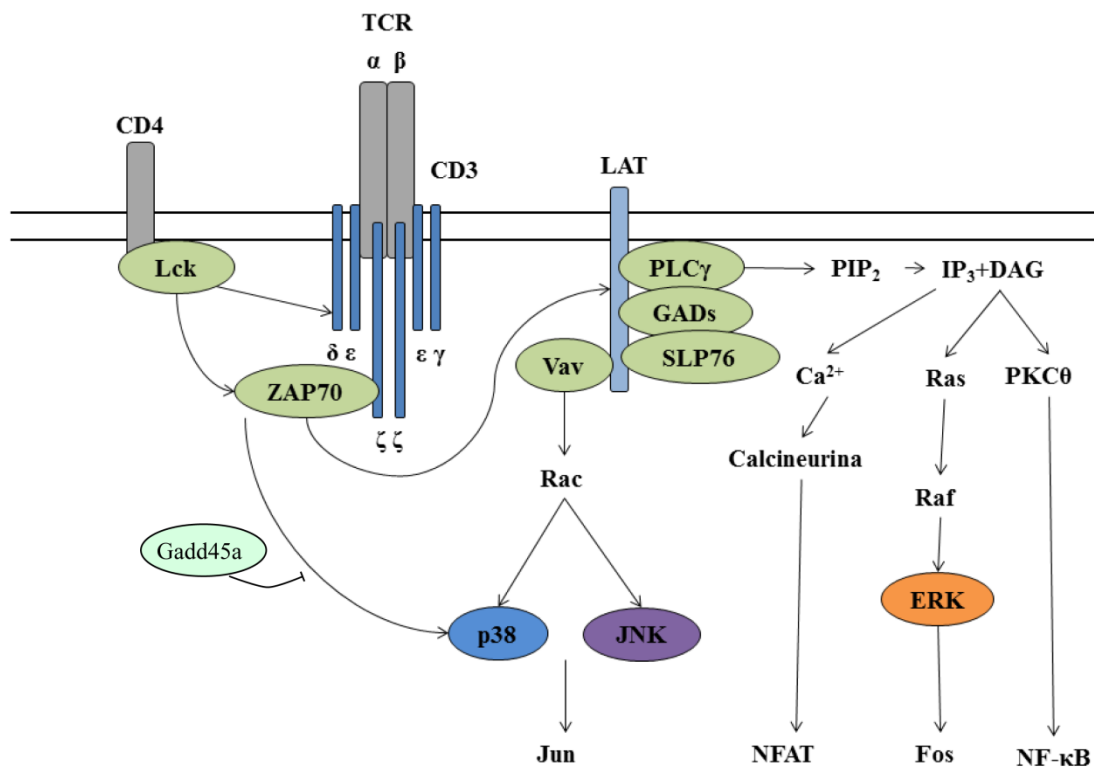


Figura I3. Representación esquemática de la señalización del TCR en células T CD4+. La interacción entre el TCR y el complejo MHC-péptido activa Lck (unida al correceptor CD4) que fosforila los motivos ITAM de las cadenas del complejo CD3ζ. A continuación, ZAP70 es reclutada y fosforilada por Lck, a su vez ZAP70 inicia la activación de distintas proteínas que culmina con la movilización de calcio, la activación de Ras y la ruta de las MAPK, así como la activación de distintos factores de transcripción (NFAT, NFκB, Jun y Fos, entre otros).

Cuando el LT reconoce el antígeno se diferencia a una célula efectora, aumentando su expresión de CD69 (Sancho et al. 2005), proteína tipo lectina implicada en la migración de los LT entre los órganos linfáticos, y aumenta la expresión de la cadena α del

receptor de IL-2, conocido como CD25 (Malek 2008), dando lugar a la producción de grandes cantidades de IL-2 necesarias para la activación autocrina de las mismas células que resulta en un aumento de su proliferación.

Durante la proliferación de los LT activados, se da lugar a dos tipos celulares: células efectoras, que desaparecerán una vez el patógeno haya sido eliminado, y células de memoria, que permanecerán circulando por el organismo a la espera de una nueva infección. Las células de memoria en los modelos murinos se caracterizan por la expresión de ciertas moléculas de adhesión como CD62L (L-selectina), necesaria para la recirculación y la entrada en los nódulos linfáticos, y CD44 (receptor de ácido hialurónico), implicada en el reclutamiento de los LT a la zona de inflamación. Las células *naïve*, que son células que nunca se han encontrado con su antígeno, expresan preferentemente CD62L y bajos niveles de CD44 mientras que las células de memoria expresan niveles bajos de CD62L y altos de CD44 (Dutton et al. 1998).

Cuando el patógeno es eliminado es necesario que la respuesta inmunitaria finalice. Esto se lleva a cabo con la llamada muerte inducida por activación (AICD) que corresponde con el proceso de contracción de la respuesta inmunitaria (Romagnani 2006).

1.3.3. Células Th1, Th2 y Th17 en la respuesta inmunitaria.

Existe una gran complejidad dentro de los tipos celulares efectores que pueden observarse dentro de las células CD4. Estos tipos celulares juegan distintos papeles en la inmunidad adaptativa, desde la eliminación de patógenos y el control de la autoinmunidad hasta la homeostasis del sistema inmunitario y la respuesta frente a tumores. Hasta el momento se han descrito siete grupos: Th1, Th2, Treg, Th17, Th9, Th22 y Th foliculares (Tfh) (Luckheeram et al. 2012) (Figura I4).

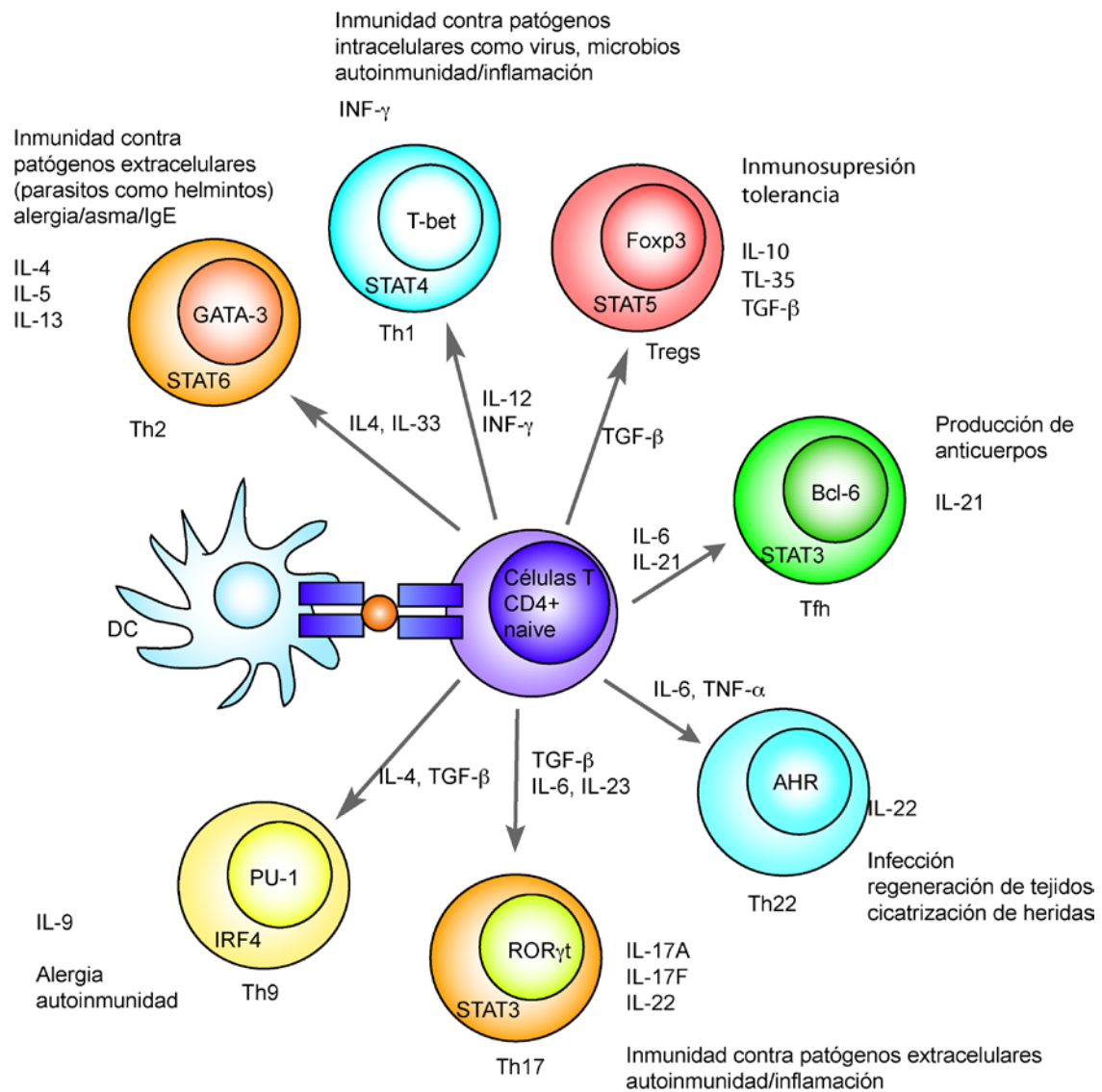


Figura 14. Desarrollo y función de los distintos tipos de células T CD4. Las células T *naïve* CD4 pueden diferenciarse a células Th1, Th2, Treg, Th17, Th9, Th22 y Th foliculares (Tfh), después de ser estimuladas por un antígeno presentado por una APC y las citoquinas presentes en el ambiente. Estos tipos de CD4 producen distintas citoquinas que contribuyen a la inmunidad adaptativa, incluyendo la eliminación de patógenos, control de la autoinmunidad, homeostasis y la repuesta contra tumores. (Modificado de (Jiang et al. 2013)).

– Th1

La diferenciación de los LT hacia células T helper de tipo I (Th1) se debe a la presencia de IL-12 e interferón γ (IFN γ) en el ambiente (Trinchieri et al. 2003), y es originada para la combatir infecciones intracelulares. IL-12 es secretada por las APCs tras su activación y esta citoquina a su vez activa a las células asesinas naturales (NK) para

producir IFN γ (Iwasaki et al. 2004). Las células Th1 están asociadas con enfermedades autoinmunes específicas de órgano como psoriasis o enfermedad de Crohn (Del Prete 1992) (Liblau et al. 1995). Producen principalmente IFN γ , linfotoxina α (Lf α) e IL-2. El IFN γ es esencial para la activación de fagocitos mononucleares, incluyendo macrófagos y células de la microglía. La IL-2 promueve la proliferación de las células CD8 y fomenta su actividad citolítica (Gattinoni et al. 2005). La IL-2 también promueve la generación de célula CD8 de memoria y las células reguladoras inducidas (iTreg) que la necesitan para su supervivencia y activación.

– Th2

Las citoquinas IL-4 e IL-2 son claves en la diferenciación a Th2. Las células Th2 participan en la respuesta a parásitos extracelulares, incluyendo helmintos, y juegan un papel principal en la inducción y persistencia del asma, además de otras enfermedades alérgicas (Del Prete 1992) (Sokol et al. 2009). Las principales citoquinas que producen son IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-10. IL-4 es una de las citoquinas más importantes en inflamación. Está involucrada en el cambio de clase de las inmunoglobulinas a IgE, en la degranulación de las células y en la liberación de histamina, responsable de la hipersensibilidad inmediata y alérgica y serotonina, que regula la secreción de hormonas y el funcionamiento vascular (revisado en (Luckheeram et al. 2012)).

– Th17

Las principales citoquinas involucradas en la diferenciación a Th17 son la IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- β .

Las células Th17 son las responsables de la respuesta a bacterias y hongos extracelulares. Producen IL-17A, IL-17B, IL-21 e IL-22. La señalización de IL-17 induce citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, IL-1, TNF α y quimioquinas proinflamatorias que aseguran la atracción de células inflamatorias al lugar de inflamación (Moseley et al. 2003). También están implicadas en la generación de enfermedades autoinmunes (Annunziato et al. 2007) (Weaver et al. 2006).

– Treg

Fueron descritas en 1995 (Sakaguchi et al. 1995) como una población de células T CD4 que expresaban la cadena α del receptor de IL-2 (CD25). Representan el 5-10% de las células CD4 y se encargan de suprimir la activación del sistema inmunitario, manteniendo la homeostasis de este sistema y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos. Están involucradas en la prevención de enfermedades autoinmunes espontáneas. Más tarde, se descubrió el factor de transcripción Foxp3 como el principal regulador del desarrollo y función de las células Treg (Chen et al. 2003). De este modo se estableció un linaje celular independiente para las células CD4+Foxp3+. La mayoría de las células Treg que se encuentran en sangre se originan en el timo y se las conoce como células Treg naturales. Las células T reguladoras inducibles se diferencian a partir de CD4+CD25⁻ tras la presentación del antígeno por células dendríticas inmaduras en presencia de citoquinas como IL-10. También, hay otras células T CD4+ reguladoras inducibles que se originan en tejidos periféricos (Tr1), no expresan Foxp3 (Passerini et al. 2011). Se localizan en tejidos inflamados y realizan su función supresora de una forma no dependiente del antígeno, a través de citoquinas supresoras como IL-10, mientras que las Treg se sitúan en los órganos linfoides periféricos y parecen actuar de forma específica de antígeno a través de señales dependientes del contacto celular y de la secreción de interleuquinas (revisado en (Sakaguchi et al. 2008)).

2. Desarrollo embrionario.

Dentro de los diferentes procesos del desarrollo embrionario, en este estudio nos centramos en la determinación del sexo.

2.1. La familia Gadd45 en el desarrollo embrionario.

Se conoce muy poco sobre la función de Gadd45 durante el desarrollo embrionario, de hecho los fenotipos desarrollados por los ratones deficientes en genes de la familia Gadd45 son poco aparentes y es necesario incluir aquí referencias a otros modelos animales además del de ratón para poder compilar suficiente información relevante. Así, se sabe que ratones deficientes en *Gadd45a* presentan una exencefalia leve (Hollander et al. 1999). En el pez cebra, *Gadd45b1* y *Gadd45b2* son necesarios para la segmentación de los somitos (Kawahara et al. 2005). En el pez medaka (*Oryzias latipes*) y en *Xenopus laevis*, *Gadd45g* se expresa en precursores neuronales primarios y participa en la regulación del ciclo celular permitiendo la salida del ciclo celular y la diferenciación (Candal et al. 2004) (de la Calle-Mustienes et al. 2002).

Recientemente, se ha descrito la expresión de los tres miembros de la familia Gadd45 en embriones de ratón de entre 6.5 días *post coitum* (dpc) y 10.5 dpc (Kaufmann et al. 2011). Este estudio muestra que *Gadd45a* se expresa de manera importante en la parte final del cierre del tubo neural, en la cadena de ganglios craneal y dorsal y en los somitos. *Gadd45b* se expresa fuertemente en el corion, pero dentro del embrión propiamente dicho se expresa débilmente en los somitos y en los primordios de las extremidades. La expresión de *Gadd45g* en ratones refleja su expresión en *Xenopus* y pez medaka en precursores primarios de neuronas y en neuronas post-mitóticas, lo que indica una función conservada de *Gadd45g* en la neurogénesis en vertebrados. También se observa una expresión leve de *Gadd45g* en los surcos genitales.

A pesar de estos estudios, no se ha encontrado hasta el momento una función clave de la familia Gadd45 en el desarrollo embrionario

2.2. Determinación del sexo.

Los mecanismos que regulan la determinación del sexo se pueden clasificar en dos grupos: ambientales y genéticos. Los primeros se caracterizan por la presencia de una señal ambiental que determina el desarrollo sexual del individuo. Por ejemplo, en numerosas especies de reptiles, el sexo está determinado por la temperatura de incubación de los huevos. Así, en la especie de tortuga *Trachemys scripta* (tortuga pintada) una temperatura de incubación superior a 30°C origina una descendencia femenina. La temperatura no es el único factor ambiental que puede condicionar la determinación sexual. Se ha descrito que tanto el pH del medio (J.-F. Baroillera 1999), la densidad poblacional (Munday et al. 2006) o la presencia o ausencia de determinadas bacterias (Beukeboom 2012) son factores claves en la determinación sexual.

Por otro lado, existen mecanismos genéticos de determinación sexual que originan las características fenotípicas diferenciales de cada sexo (Gilbert 2000). Uno de los primeros mecanismos descritos fue el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En este caso, la relación entre el número de cromosomas X y de complementos autosómicos determina el sexo. De modo que si la relación entre autosomas y cromosomas X es igual a 0,5 se originará una hembra, mientras que si la relación es igual a 1 se generará un macho (Bridges 1925). Cuando se descubrieron por primera vez los cromosomas humanos X e Y por Painter y colaboradores en 1923, se pensaba que el sexo estaría determinado por la dosis de cromosomas X independientemente de la presencia del cromosoma Y. Sin embargo, la descripción de una mujer 45XO, con síndrome de Turner (Ford et al. 1959) y un hombre 47XXY con síndrome de Klinefelter (Jacobs et al. 1959) demostraron por un lado, que no era necesaria una doble dosis del cromosoma X para el desarrollo femenino y por otro lado, que se puede originar un desarrollo masculino con una doble dosis del cromosoma X. Además, independientemente de la dosis del cromosoma X, la presencia del cromosoma Y se consideró clave para el desarrollo masculino. En mamíferos, las hembras tienen dos cromosomas X y los machos portan un cromosoma X y un cromosoma Y. Las hembras solo pueden producir un tipo de gametos que contienen el cromosoma X, mientras que los machos pueden generar dos tipos de gametos (la mitad portarán el cromosoma X y la otra mitad llevará el cromosoma Y). Por tanto, si el

óvulo recibe otro cromosoma X del gameto masculino, el individuo resultante será XX, desarrollará ovarios y será hembra. Si el óvulo recibe un cromosoma Y el individuo será XY, desarrollará testículos y será macho.

Aunque en la década de los sesenta ya se sabía que el determinismo masculino estaba condicionado a la presencia del cromosoma Y, no se conocía el locus responsable del mismo. Por ello, se asignó el nombre de *testis determination factor* (*TDF*) en humanos (sex-determining region Y (*Tdy*) en ratón) al gen candidato a ser responsable del desarrollo de testículos. Mediante la generación de diversos mapas de delección (descripción de cromosomas en base a la presencia de mutaciones puntuales que sirven como marcadores de regiones específicas del mismo) se observó que “este locus determinante de sexo” debía estar próximo al límite con la región pseudoautosómica en el cromosoma Y (Guellaen et al. 1984) (Palmer et al. 1989). Finalmente, fue el análisis del ADN de los hombres XX y mujeres XY (en los que el sexo cromosómico no coincide con el fenotípico) el que permitió a Sinclair y colaboradores la identificación del *TDF* en una secuencia conservada en el cromosoma Y que se correspondía con el gen *SRY* (*sex-determining region on the Y chromosome*). Igualmente, en el genoma de ratón se identificó el gen homólogo *Sry* y de hecho, su delección originó una línea de ratones hembras XY (Gubbay et al. 1990). Adicionalmente, Koopman y colaboradores (Koopman et al. 1991) obtuvieron ratones transgénicos XX con fenotipo masculino tras insertar en un autosoma un fragmento de secuencia de 14 kilobases que contenía el gen *Sry*. Estos experimentos demostraron que *SRY* y *TDF* eran la misma entidad responsable del desarrollo testicular.

2.3. Desarrollo de la gónada en mamíferos.

El desarrollo gonadal es un proceso excepcional en el que se pueden originar dos estructuras completamente distintas a partir de un mismo primordio indiferenciado. Este proceso está bien conservado en mamíferos, por ello, aunque existen ciertas variaciones, centraremos su explicación en ratón.

El desarrollo de las gónadas se produce en dos fases: primera, caracterizada por la generación de la gónada indiferenciada (gónada bipotencial o surco genital) y segunda,

caracterizada por la diferenciación hacia un testículo o a un ovario que condicionara el fenotipo masculino o femenino del individuo.

2.3.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada.

En el embrión de ratón, la gónada indiferenciada se genera a partir del mesodermo intermedio y se divide en tres regiones compuestas por: a) el pronefros, en la parte anterior que contiene el primordio de la glándula adrenal; b) el mesonefros, en la zona central donde aparece el surco genital y, c) el metanefros, en la parte posterior que dará lugar al riñón (Ver Figura I5).

El primordio gonadal aparece como un engrosamiento en la superficie ventrolateral del mesonefros sobre 9.5 dpc. Este engrosamiento se debe a la proliferación de células del epitelio celómico y de células del interior del mesonefros. Desde los estadios iniciales del desarrollo de la gónada, pueden observarse los tubos mesonéfricos, aunque aún no se conoce una función específica para ellos (Karl et al. 1995).

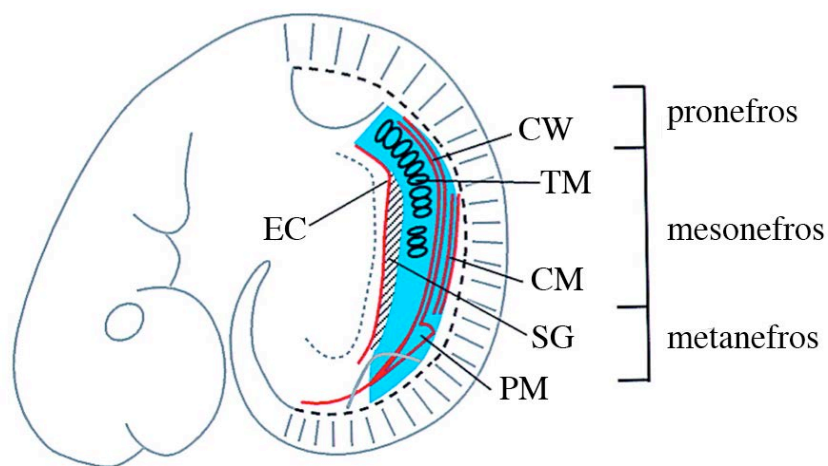


Figura I5. Estructura del sistema urogenital. Esquema del sistema urogenital del ratón a 10.5 dpc. Las estructuras epiteliales se muestran en rojo, las estructuras mesenquimales se muestran en azul y la zona rayada se corresponde con el surco genital (SG). (CW) conducto de Wolff, (TM) túbulos mesonéfricos, (CM) conducto de Müller, (PM) células peritubulares mioideas, (EC) epitelio celómico. (modificado de (Swain et al. 1999)).

La gónada indiferenciada está compuesta por células precursoras bipotenciales que pueden seguir dos destinos dependiendo del ambiente masculino o femenino en el que se encuentren. Entre estos precursores bipotenciales están: a) las células germinales primordiales que pueden iniciar la ruta espermatogénica o la oogénica, b) las células sostén que originan las células de Sertoli en el macho y las células foliculares en la hembra y c) las células esteroidogénicas que producen las hormonas esteroideas dando lugar a las células de Leydig en machos y a las células de la teca en hembras.

2.3.2. Las células germinales primordiales.

Las células germinales primordiales (PGCs) migran desde el alantoides en la parte final posterior de la línea primitiva hasta el surco genital (ver Figura I6), a dónde llegan entre los días 10-11 dpc después de haber proliferado en el trayecto (Leitch et al. 2013).

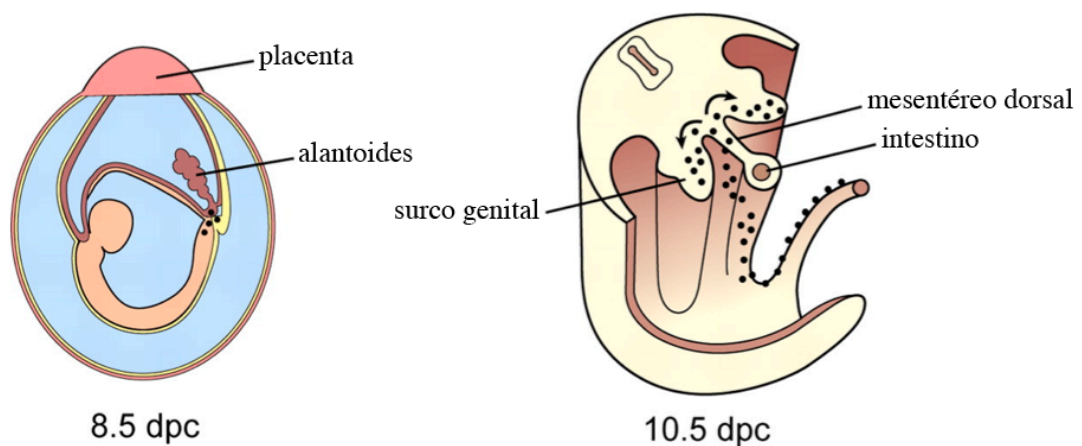


Figura I6. Origen y migración de las células germinales primordiales (PGCs). Las PGCs migran desde la base del alantoides en la parte final posterior de la línea primitiva, llegando al surco genital alrededor de 11.5 dpc. (Modificado de (Wilhelm et al. 2007))

Una vez dentro del surco genital, las células germinales pierden la movilidad y comienzan a agregarse. Continúan dividiéndose dentro de la gónada indiferenciada hasta 13 dpc, donde las células germinales pueden ser incluidas dentro de los cordones testiculares y entran en arresto mitótico como proespermatogonias T1 en los

machos, o bien la proliferación continúa por un tiempo hasta que entran en meiosis a 13.5 dpc en las hembras.

Por tanto, las PGCs, tienen el potencial de desarrollarse como oocitos meióticos, pasando por la primera profase meiótica y quedando en arresto en la fase de diploteno justo después del nacimiento, o como proespermatogonia, en arresto mitótico hasta unos pocos días antes del nacimiento, cuando se reinicia la proliferación (Hilscher et al. 1974) (McLaren et al. 1984). Este cambio en el desarrollo, que tiene lugar a 13.5 dpc, se debe al sexo de las células somáticas en la gónada, en lugar de al sexo cromosómico de las PGCs (Palmer et al. 1991) (Ford et al. 1975).

2.4. Diferenciación de los testículos.

Los testículos se desarrollan a partir del surco genital debido a la expresión del gen *Sry* en las células precursoras somáticas que darán lugar a las células de Sertoli, las células encargadas de dirigir el desarrollo testicular. En este apartado se hablará de las células de Sertoli y las células de Leydig (productoras de hormonas que determinaran las características secundarias del individuo). Otros tipos celulares presentes en el testículo son: las células germinales y las células mioideas peritubulares.

2.4.1. Células de Sertoli.

Las células de Sertoli son células somáticas que se asocian con las células germinales y les ayudan a desarrollarse para formar el espermatozoide. Son las primeras células que se diferencian de los precursores bipotenciales y por tanto son el primer indicador de que la gónada ha pasado de la fase indiferenciada a la fase de desarrollo de testículos. Estudios de hibridación *in situ* (Koopman et al. 1990) han demostrado que *Sry* se expresa en la gónada a 11.5 dpc y que su expresión está asociada con las células somáticas del surco genital y no con las células germinales (Rossi et al. 1993). La expresión de *Sry* está restringida a células de pre-Sertoli, que tras expresar *Sry* comienzan a expresar inmediatamente *Sox9*, que es un marcador de las células de Sertoli (Wilhelm et al. 2005). Además de las células que autónomamente se diferencian a células de Sertoli, también existe una acción paracrina en la que las células que se están diferenciando a células de Sertoli producen prostaglandina D2 que recluta células que no expresan *Sry* hacia la diferenciación a células de Sertoli para asegurar la obtención de un número

suficiente de estas células para asegurar la diferenciación testicular (Wilhelm et al. 2007) (Palmer et al. 1991). La diferenciación de células de pre-Sertoli a células de Sertoli está marcada por la polarización de las células para formar los cordones testiculares (Figura 17). Para garantizar el desarrollo testicular es necesario alcanzar un número mínimo de células de Sertoli (Palmer et al. 1991). En paralelo a la diferenciación de las células de Sertoli, la gónada aumenta de tamaño debido a la proliferación y llegada de células del mesonefros. Este proceso ocurre solo en machos tras el inicio de la expresión de *Sry* (Lizotte et al. 2002) (Schmahl et al. 2000) (Capel et al. 1999). Estas células dan lugar a las células mioides peritubulares (se sitúan rodeando las células de Sertoli en los cordones testiculares), a células endoteliales (que dan lugar a la vasculatura) y a parte de las células de Leydig.

En torno a 12.5 dpc, las células de Sertoli comienzan a producir la hormona anti-Mülleriana (AMH) que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller, que son los precursores de los órganos sexuales femeninos (oviducto, útero y parte superior de la vagina) (Munsterberg et al. 1991).

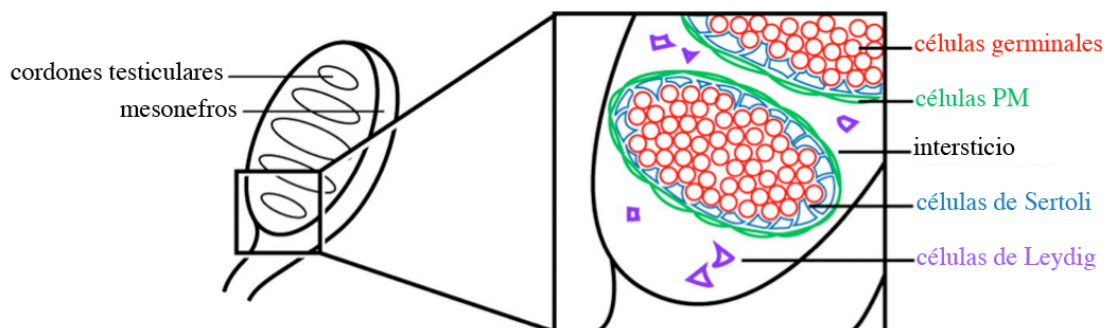


Figura 17. Distribución de los diferentes tipos celulares en una gónada masculina. La gónada se organiza en cordones testiculares en los que las células mioides peritubulares (PM) se localizan rodeando una monocapa de células de Sertoli y las PGCs. En los intersticios se encuentran las células de Leydig productoras de andrógenos. (Modificado de (Wilhelm et al. 2007))

2.4.2. Células de Leydig.

Hay dos poblaciones de células de Leydig: las células de Leydig fetales, que están presentes en el intersticio de los testículos desde 12.5 dpc hasta poco después del

nacimiento, y las células de Leydig adultas, que surgen durante la pubertad (Hardy et al. 1991).

Las células de Leydig fetales producen hormonas para la masculinización del embrión, incluyendo la diferenciación de los conductos de Wolff, el descenso de los testículos, la masculinización de los genitales externos y el dimorfismo sexual del cerebro. La producción de testosterona por las células fetales empieza alrededor de 12.5-13 dpc y alcanza un pico antes del nacimiento (Gondos et al. 1980). Los andrógenos secretados inducen la formación de los genitales internos masculinos a partir de los conductos de Wolff que consisten en el epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales.

2.4.3. Formación de los cordones testiculares.

La formación de los cordones es un evento clave en el desarrollo de los testículos y para que esto tenga lugar se requiere la migración de células desde el mesonefros (Brennan et al. 2004). La formación de los cordones se debe a la reorganización de las células de Sertoli entorno a las PGCs, ambas, a su vez rodeadas por las células peritubulares mioides. Esto permite aislar a las células creando el ambiente necesario para el correcto desarrollo del espermatozoide (Hadley et al. 1985). Experimentos en los que se bloqueó la migración de células del mesonefros demostraron que su ausencia no afecta a la diferenciación de las células de Sertoli pero sí la formación de cordones y la vascularización. La alteración del patrón de vascularización sugiere que la población que migra está formada mayoritariamente por células endoteliales (Tilman et al. 1999). Experimentos en los que se cultivaron gónadas que normalmente formaban ovotestis mostraron que la migración estaba ausente en las zonas ováricas y restringida a las zonas donde se formaban los cordones testiculares. La migración coincide con la formación de la vasculatura del testículo, que a su vez favorece la partición de la gónada y distribución en los cordones testiculares (Brennan et al. 2002).

2.5. Diferenciación del ovario.

El ovario tiene dos funciones principales: la producción de hormonas esteroideas y la generación de oocitos maduros capaces de ser fertilizados y dar lugar a un embrión. La unidad funcional del ovario es el folículo, dentro del cual el oocito madura rodeado

de células granulosas y células de la teca. Los folículos comienzan su diferenciación después del nacimiento. En las hembras, a diferencia de los machos en los que la diferenciación comienza de manera abrupta con la expresión de *Sry*, la gónada fetal parece estar inerte durante varios días. De hecho, no se observa ningún cambio morfológico hasta los 13.5 dpc. Sin embargo (ver Figura 18), se detecta una expresión específica de genes desde 11.5 dpc (Nef et al. 2005). A partir de 13.5 dpc las células germinales comienzan la meiosis en el extremo anterior de la gónada y esto provoca una reestructuración del ovario que da lugar a la foliculogénesis. Los oocitos se desarrollan como quistes interconectados por puentes citoplasmáticos (Pepling et al. 1998). Se produce gran vascularización del tejido y estos vasos marcan filas de células germinales, también conocidas como cordones ováricos.

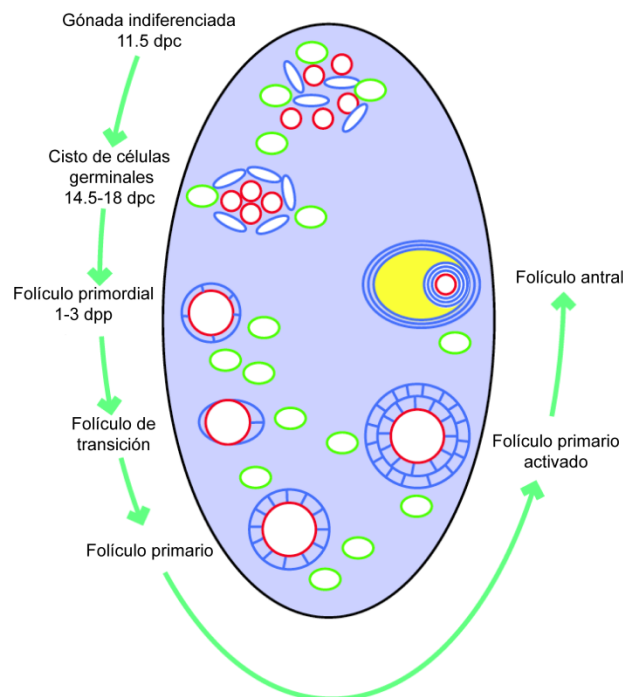


Figura 18. Desarrollo y diferenciación ovárica y folicular. Los oocitos se muestran en rojo, las células de pregranulosa en azul, las células esteroidogénicas teca en verde y el fluido antral en amarillo (modificado de (Wilhelm D 2007)).

Durante los tres primeros días después del nacimiento, se origina una rápida reorganización del ovario. Los puentes intercelulares entre los oocitos se rompen y los oocitos individuales son rodeados por una capa de células pregranulosas. Estos

folículos primordiales son aislados del resto por una membrana basal alrededor de las células pregranulosas. Al mismo tiempo, el ovario se reorganiza en compartimentos: el córtex (donde residen los folículos primordiales) y la médula. Durante la formación de los folículos primarios muchos oocitos mueren por apoptosis (Felici et al. 1999). Esta muerte masiva limita el número de folículos primordiales. La proliferación de las células germinales en las hembras solo ocurre durante la embriogénesis, a diferencia de los machos en los que la proliferación de las células germinales es continua (Borum 1967). Durante la formación de los folículos primarios, las células pregranulosas se vuelven cuboidales y comienzan a proliferar, el oocito crece de tamaño, produce la zona pelúcida (una matriz extracelular de glicoproteínas depositada entre el oocito y las células granulosas) y el folículo es rodeado por células tecales. Otros folículos primordiales permanecen quiescentes de manera que hay una producción continua de folículos preovulatorios y folículos en distintos estadios (primordial, primario, transitorio, secundario y antral) en cualquier momento.

2.6. Genes implicados en la determinación del sexo.

2.6.1. *Sry*.

El gen *Sry* (*sex-determining region on the Y chromosome*) está localizado en el brazo corto del cromosoma Y. La región codificante consta de un único exón de 887 pares de bases (bp) en humanos (que codifica para una proteína de 204 aminoácidos, aa) y 1188 bp en ratón (proteína de 395 aa).

La proteína SRY pertenece a la familia HMG (*high mobility group box*) de proteínas nucleares caracterizadas por poseer un dominio de unión a ADN. En el caso de SRY, la unión a ADN es dependiente de la secuencia (mientras que otras proteínas de la familia, como HMG-1 y HMG-2, se unen a ADN de forma secuencia-independiente). Además, a ambos lados del dominio HMG existen secuencias que constituyen señales de localización nuclear. Se han descrito casos de reversión del sexo por mutaciones en cada uno de los dominios de localización nuclear, por lo que ambos son necesarios para alcanzar los niveles de SRY en el núcleo (Kaur et al. 2010). En cuanto a interacciones con otras proteínas, se ha descrito que SRY se une por el dominio C-terminal a importina $\beta 1$ (Imp $\beta 1$) y por el N-terminal a calmodulina. Son pocos los genes que se

sabe que son regulados por SRY. La principal diana caracterizada es *Sox9*, cuya expresión es inducida por la unión de SRY y SF1 a la región reguladora del mismo (Sekido et al. 2008). Otra diana es la cerebelina 4 (*Cbln4*) (Bradford et al. 2009). Además se ha descrito que *Sry* podría actuar reprimiendo un regulador negativo de la determinación masculina del sexo (McElreavey et al. 1993).

SRY regula la expresión de genes uniéndose al surco menor del ADN y provocando en él una curvatura brusca de 60-85° (ver Figura I9). El análisis bioquímico de la proteína SRY en humanos XY con reversión del sexo reveló que la función específica de SRY es la de inducir curvatura en el ADN (Harley et al. 1992) (Pontiggia et al. 1994). Muchas de las mutaciones encontradas en SRY que causan reversión del sexo están situadas en el dominio HMG de unión a ADN.

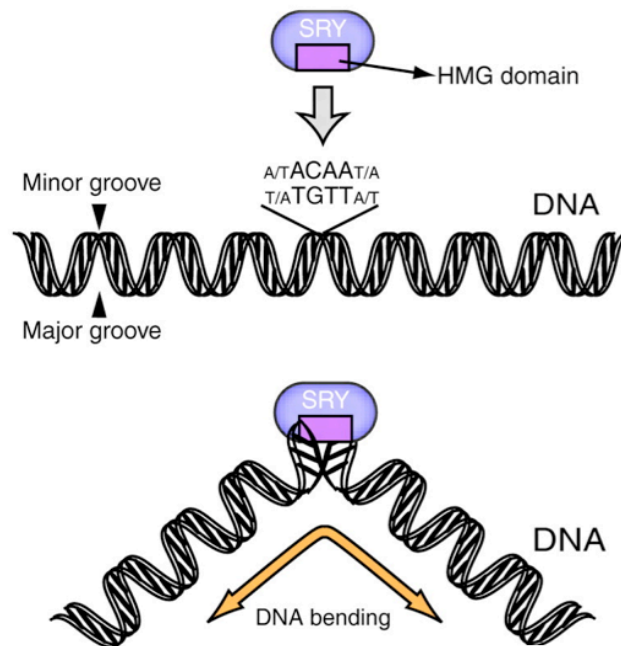


Figura I9. Mecanismo de acción de Sry sobre el ADN. La unión de Sry a una secuencia específica en el ADN induce un giro en este que permite la transcripción de *Sox9*. (Kashimada et al. 2010)

En ratón la expresión de *Sry* durante la gonadogénesis está estrictamente regulada y sigue un patrón consistente en forma de ola. Experimentos de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia han revelado que la expresión de ARNm y de la proteína de SRY comienza a 10.5 dpc en el centro de los surcos genitales XY, abarca toda la gónada y alcanza el pico de expresión a 11.5 dpc. Después, a 12 dpc, comienza a retroceder de

forma anteroposterior quedando las últimas células positivas en el polo caudal (Taketo et al. 2005). La expresión de *Sry* solo es efectiva si se inicia durante un período muy restringido de tiempo, como quedó demostrado en los ratones portadores del llamado “alelo débil de *Sry*” (reversión del sexo B6-Y^{POS} (Eicher et al. 1995)). En estos ratones, la expresión de *SRY* empieza unas horas más tarde y el resultado es la formación de ovotestis (Bullejos et al. 2005) (Hiramatsu et al. 2009). No solo el tiempo de inicio de la expresión de *Sry* es crítico para su función sino también el nivel de expresión que alcanza. Así, para inducir el desarrollo de testículos es necesario alcanzar un determinado umbral mínimo de expresión de *Sry* (Nagamine et al. 1999). En contraste con la importancia crítica del tiempo de inicio, la duración en el tiempo de la expresión de *Sry* parece ser irrelevante y varía entre especies. Por ejemplo, en humanos, cabras y wallabies, la expresión se observa más a allá del nacimiento (Hanley et al. 2000).

A pesar de su importancia en la determinación del sexo, se sabe poco de la regulación de la expresión de *Sry*. Las regiones que flanquean el gen están poco conservadas entre los mamíferos. Aunque a 5' de *Sry* se han encontrado fragmentos de secuencia conservados entre humanos, bóvidos, cerdos y cabras (Ross et al. 2008), la relevancia funcional de estas regiones no ha sido determinada. A pesar de esto, varios proteínas han sido implicados en la regulación de la expresión de *Sry*, como: WT1 (+KTS) (Barbaux et al. 1997) (Guo et al. 2002), CBX2 (Katoh-Fukui et al. 2011), GATA4/FOG2 (Tevosian et al. 2002), MAP3K4 (Bogani et al. 2009), IR, IRR e IGF1R (Nef et al. 2003) (Biaison-Lauber 2010). Ratones deficientes en estas proteínas muestran una expresión reducida de *SRY*, y resultan en una reversión de sexo XY. No queda claro, en la mayoría de los casos, si la pérdida de estas proteínas origina una reducción en los niveles de expresión de *Sry* por célula o si disminuye el número total de células que lo expresan. Tampoco se conoce en detalle como la ausencia de estas proteínas afecta a la expresión de *Sry*. Así, FOG2 (*friend of GATA2*) está relacionado más con la represión que con la activación de genes diana de GATA4, tales como la hormona anti-Mülleriana (*Amh*) y α -inhibina (Robert et al. 2002). CBX2, MAP3K4 y los receptores de insulina no son factores de transcripción y no se sabe cómo ejercen su influencia sobre *Sry*. La reducción de WT1 (+KTS) en humanos produce una reversión del sexo XY, acompañada de una condición conocida como síndrome de Frasier (Barbaux et al. 1997). Estudios en ratones mostraron que WT1 (+KTS)

juega un papel en la regulación de *Sry* en células individuales del linaje de las células de Sertoli (Bradford et al. 2009), pero no se conoce si *Sry* es una diana directa o indirecta de WT1.

En resumen, la regulación de los niveles y el comienzo de la expresión de *Sry* es crítico para la diferenciación de las células de Sertoli y por tanto para el desarrollo de testículos. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta regulación no son del todo conocidos.

2.6.2. *Sox9*.

Sox9 es el principal gen diana de *Sry*. Es un factor de transcripción que pertenece a la familia Sox [*SRY (sex-determining region on the Y chromosome)-related HMG-box*], al igual que *Sry*, e interacciona con el ADN a través de su dominio HMG (Sudbeck et al. 1996). Se localiza en el cromosoma 17 en humanos y en el 11 en ratones. El gen *Sox9* abarca tres exones que dan lugar a una proteína de 509 aa en humanos y 507 aa en ratones.

Inicialmente *Sox9* se expresa tanto en gónadas XX como XY, sin embargo solo en las gónadas XY la expresión de *Sox9* se induce fuertemente en las células de pre-Sertoli, inmediatamente después de la expresión de *Sry* para seguir un patrón de expresión similar a este (Sekido et al. 2004) (Bullejos et al. 2005). La región 5' no traducida reguladora de transcripción de *Sox9* se extiende más de 1 Mb (Sekido et al. 2009) (Sekido et al. 2008). Entre las secuencias reguladoras localizadas se ha descrito un *enhancer* a 13 kb del sitio de inicio de transcripción al que se ha denominado TES (*testis-specific enhancer of Sox9*). Dentro de esta secuencia se ha encontrado un motivo muy conservado entre ratón, rata, perro y humano (TESCO) (Sekido et al. 2008). La expresión de *Sox9* es dependiente de la unión sinérgica de los factores de transcripción SF1 y SRY a TESCO, como se ha demostrado en experimentos en ratones deficientes en estas dos proteínas, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y ensayos *in vitro* de activación con la secuencia reguladora unida a un gen reportero (*LacZ*) (Jakob et al. 2011) (Sekido et al. 2008) (Barrionuevo et al. 2006). Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que SOX9 es el responsable del silenciamiento de la expresión de *Sry* ya que la expresión de *Sry* se mantiene en gónadas en las que o bien *Sox9* se ha deletado o bien su expresión es deficiente (como en casos de reversión del sexo XY (Sekido et al. 2009)). La expresión de

Sox9 se mantiene en las gónadas durante toda la vida después de que *Sry* se haya dejado de expresar. Esto indica que existen otros factores involucrados en el mantenimiento de la expresión de *Sox9*. De hecho, la propia proteína SOX9 es muy eficiente uniéndose y activando TESCO en presencia de SF1 *in vitro* y en concreto, se ha descrito una interacción directa entre estas dos proteínas para la activación del promotor de *Amh* (una de las principales dianas de *Sox9*) (De Santa Barbara et al. 1998). Además, se han descrito otras proteínas necesarias para el correcto mantenimiento de los niveles de expresión de *Sox9* como son FGF9 (*fibroblast growth factor 9*) y FGFR2 (*FGF receptor 2*) (Siggers et al. 2014). En ratones deficientes en estas dos últimas proteínas se ha descrito que aunque la expresión de SOX9 comienza de manera normal, a los 11.5 dpc la expresión disminuye provocando una reversión del sexo (Kim et al. 2007) (Bagheri-Fam et al. 2008). Igualmente, en humanos se ha descrito reversión del sexo XY en pacientes con una delección en la región cromosómica que contiene el gen *Fgfr2* (10q26) (Wilkie et al. 1993). Entre todas estas proteínas (Figura I10) se ha descrito la existencia de un bucle de retroalimentación positivo en el que SRY lleva a la activación de SOX9, que a su vez activa FGF9 que vía FGFR2 actúa de nuevo sobre las propias células de pre-Sertoli (DiNapoli et al. 2008) (Siggers et al. 2014). De este modo, se asegura que todas las células de sostén presentes en la gónada pasen a ser células de Sertoli y la formación de los cordones testiculares tenga lugar de forma coordinada (DeFalco et al. 2009) (Hiramatsu et al. 2009). Además, existen otros bucles de retroalimentación que ayudan al establecimiento de las células de Sertoli, aunque de manera menos crítica. Por ejemplo se ha descrito: a) que *Sox9* activa la transcripción de *Sf1* (Shen et al. 2002); b) que Prostaglandina D2 promueve y a su vez es diana de *Sox9* (Moniot et al. 2009); y c) que *Sox8* y *Sox10* (que pertenecen a la misma familia que *Sox9*) se expresan inmediatamente después que *Sox9* en la gónada con funciones redundantes a *Sox9* en el desarrollo y mantenimiento de las células de Sertoli (Polanco et al. 2010) (Barrionuevo et al.). Además de la influencia en su propia expresión, *Sox9* desencadena la expresión de otros genes que también son necesarios para el correcto desarrollo de la gónada masculina como *Amh* (Arango et al. 1999), *Vanin-1* (Wilson et al. 2005), y *Ptgds* (prostaglandina D sintasa) (Wilhelm et al. 2007) (revisado en (Jakob et al. 2011) (Wainwright et al. 2010)).

La prueba definitiva del valor crítico de *Sox9* en la determinación de la gónada masculina está en humanos con mutaciones en *Sox9* que desarrollan la enfermedad llamada displasia campomélica. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de malformaciones esqueléticas y, en una gran proporción de pacientes, por la reversión del sexo de macho a hembra (Foster et al. 1994) (Wagner et al. 1994).

2.6.3. Hormona anti-Mülleriana (AMH).

El gen que codifica para la AMH se localiza en el cromosoma 19 en humanos y codifica para una proteína de 560 aa. Pertenece a la superfamilia de TGF- β y, su producción por parte de las células de Sertoli es responsable de la regresión de los conductos de Müller que en individuos XX dan lugar a las trompas de Falopio, útero y la parte superior de la vagina. Induce la muerte por apoptosis de las células epiteliales del conducto (Allard et al. 2000) (di Clemente et al. 1994) (Roberts et al. 1999). Además, parece tener una función minoritaria en la proliferación de las células germinales y células de Leydig. La ausencia de una correcta acción de la AMH lleva a la generación del síndrome del conducto de Müller persistente que suele estar asociado con criptorquidia (testículos no descendidos) y hernia inguinal. Los individuos suelen ser varones genotípica (46, XY) y fenotípicamente (genitales externos virilizados normales) aunque pueden ser infértiles debido a que los testículos no están conectados correctamente con los conductos excretores (Imbeaud et al. 1994). Sin embargo, estudios en ratones deficientes en esta hormona parecen indicar que la AMH no es esencial en el establecimiento de la gónada masculina y la posterior masculinización del fenotipo (Behringer et al. 1994).

En humanos, alrededor del 45% de los casos del síndrome del conducto de Müller persistente se debe a una mutación del gen que codifica para la hormona AMH que se transmite de manera autosómica recesiva.

2.7. Antagonismo entre la cascada de desarrollo masculina y la femenina.

La determinación del sexo tanto masculino como femenino es un proceso activo en el que se requiere la expresión y activación de determinados genes (Nef et al. 2005). La

gónada se encuentra durante un tiempo en un equilibrio entre la señalización masculina y femenina establecido por la señalización antagonística entre WNT4 (*wingless-related MMTV integration site 4*) y FGF9 (*fibroblast growth factor 9*) (Kim et al. 2006). La determinación sexual se realiza favoreciendo el desequilibrio hacia una de las posibilidades. Este desequilibrio se mantiene reforzando una de las cascadas y reprimiendo la alternativa. Estas dos cascadas son antagonistas y establecen una regulación cruzada entre sí. Así, cuando se produce un bloqueo del desarrollo masculino por deficiencia en *Fgf9*, como resultado, el desarrollo femenino se ve inducido por la expresión de *Wnt4* (Kim et al. 2006). Y, al contrario, cuando *Wnt4* es eliminado, el desarrollo masculino es estimulado (Vainio et al. 1999). Este fenómeno se correlaciona con casos de DSD (desórdenes del desarrollo sexual) en los que la pérdida de WNT4 provoca la masculinización de individuos XX y su duplicación origina la feminización de individuos XY (Biason-Lauber et al. 2004) (Jordan et al. 2003). También se ha demostrado este antagonismo en estudios *ex vivo*. El tratamiento de gónadas XX con FGF9 ectópico suprime la expresión de *Wnt4* e induce la de *Sox9* (Kim et al. 2006). También se han establecido antagonismos entre *Sox9/Wnt4* y *Sox9/Foxl2* (Uhlenhaut et al. 2009).

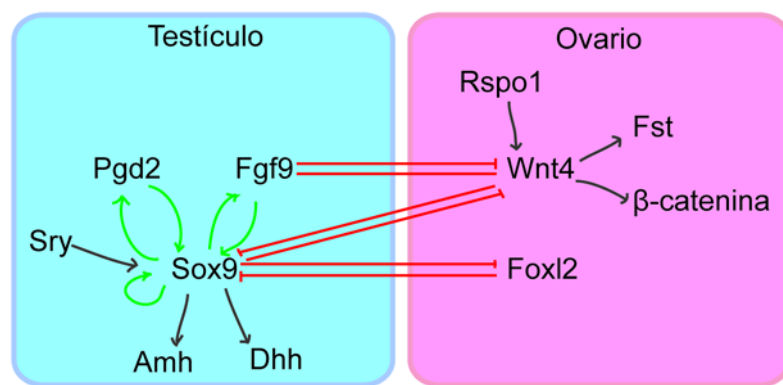


Figura I10. Esquema de las interacciones y antagonismos entre la cascada masculina y la femenina.

En estudios más recientes se ha visto que el antagonismo entre el programa masculino y femenino, también es importante después del nacimiento. Existen proteínas encargadas del mantenimiento de los testículos y los ovarios, como DMRT1 (*doublesex and mab-3-related transcription factor 1*) y FOXL2 (*forkhead box L2*)

respectivamente (Schmidt et al. 2004). En humanos, la hemicigosis de DMRT1 causa hipogonadismo con gónadas hipoplásicas. La mutación de FOXL2 está asociada a un fallo ovárico prematuro en humanos y ratones (Crisponi et al. 2001, Schmidt et al. 2004, Uda et al. 2004). Existe una regulación mutua entre DMRT1 y FOXL2 (Matson et al. 2011) (Uhlenhaut et al. 2009).

En la Figura I11 se muestra un esquema temporal a modo de resumen de la determinación sexual en ratón. Para que la determinación del sexo tenga lugar, primero debe establecerse la gónada indiferenciada a 10.5 dpc, a continuación la expresión de SRY debe de inducirse en las células somáticas de la gónada masculina en el momento preciso alcanzando su pico de expresión a 11.5 dpc y después desapareciendo a 12.5 dpc. Poco tiempo después se induce la expresión de SOX9 alcanzando un máximo a 12.5 dpc y manteniendo su expresión postnatalmente gracias a una serie de bucles de retroalimentación que la refuerzan. A 12.5 dpc los cordones testiculares se están formando y ya son evidentes las diferencias morfológicas entre el testículo y el ovario. En ausencia de la expresión de SRY, se induce la formación del ovario por la expresión de genes específicos femeninos como WNT4, RSPO1 o FOXL2.

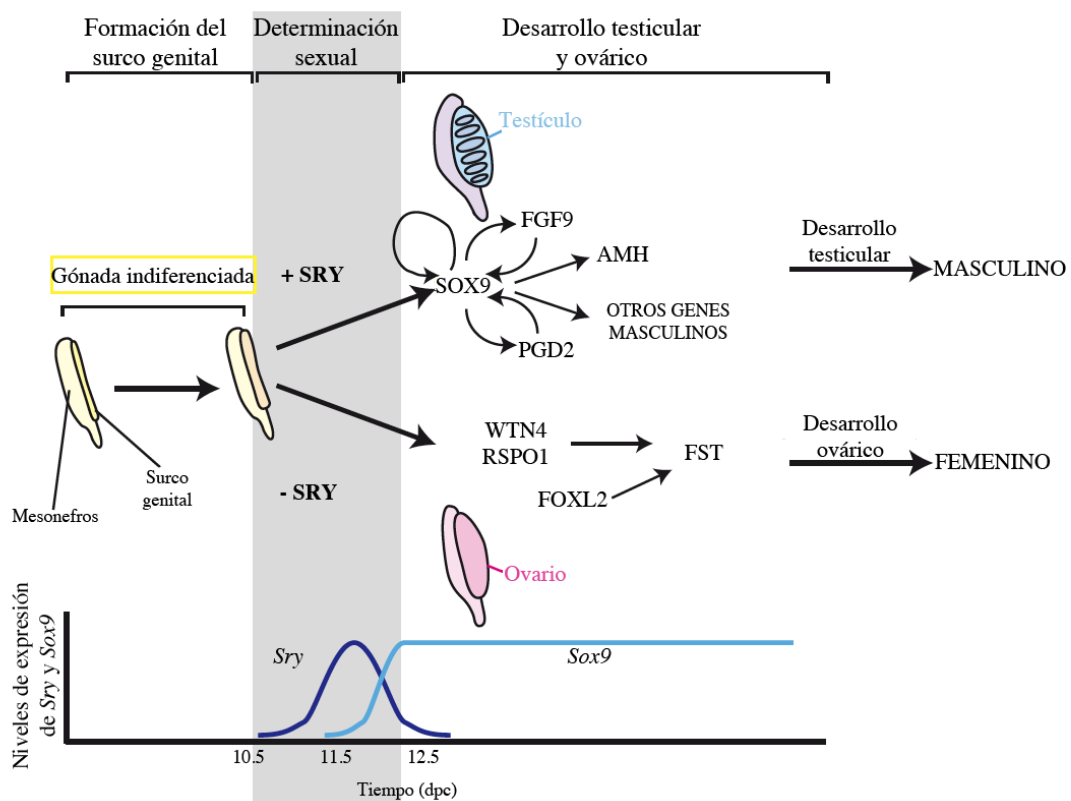


Figura I11. Esquema temporal de la determinación sexual. En gris se destaca el periodo de determinación del sexo. Durante este periodo se induce la expresión de las proteínas clave en la determinación masculina: *Sry* (azul oscuro) y de *Sox9* (azul claro). Ante de la franja gris se representa el periodo indiferenciado de la gónada. Después de la expresión de *SRY* ya se puede distinguir morfológicamente el ovario o el testículo y se representan algunos de los genes claves en su desarrollo (modificado de (Kashimada et al. 2010))

2.8. El fondo genético en la determinación del sexo.

Se han caracterizado diferencias en los fenotipos gonadales dependiendo de la cepa de ratón utilizada. Por ejemplo, la cepa C57BL/6J (BL6) es especialmente sensible a la reversión del sexo XY en respuesta a la introducción del cromosoma Y de *Mus poschnavinus* (Y^{POS}) (Eicher et al. 1982). Otras cepas, que incluyen la DBA/2J y la 129S1/SvImJ (129), son completamente resistentes a la reversión del sexo por Y^{POS} . También se ha observado que la cepa BL6 es sensible a la reversión del sexo XY en respuesta a otras perturbaciones genéticas como mutaciones o deleciones de genes que incluyen *Fgf9* (Colvin et al. 2001), *Dax1* (*Nrob1*) (Meeks et al. 2003), *Sf1* y *Wt1* (Brennan et al. 2004).

En un estudio en el que se comparaba el transcriptoma de las gónada XY en el momento crítico de la determinación del sexo (11.5 dpc) de diferentes cepas, se revelaron importantes diferencias entre las cepas BL6 y 129 (Munger et al. 2009). Se observó que los genes involucrados en el desarrollo femenino estaban aumentados en la cepa BL6 en comparación con la 129, dando una posible explicación a porqué la cepa BL6 es más sensible a la reversión del sexo. Es llamativo que la expresión de *Sox9* en la cepa BL6 es mayor que en las otras cepas, actuando como un mecanismo compensatorio para asegurar el desarrollo de testículos dentro de esta cepa. Como consecuencia del ligero desequilibrio hacia el desarrollo femenino, el equilibrio transcripcional en los BL6 es especialmente vulnerable a la introducción de variantes alélicas que retrasen o reduzcan los niveles de expresión de *Sry* o *Sox9* (Bouma et al. 2005) (Bullejos et al. 2005), o a mutaciones en heterocigosis de genes que regulan positivamente *Sry* o *Sox9* (Colvin et al. 2001).

2.9. Desórdenes del desarrollo sexual (DSD)

Los desórdenes del desarrollo sexual se deben a un desarrollo sexual cromosomal, gonadal o anatómico atípico (Hughes et al. 2006). Estos desórdenes incluyen una gran variedad de fenotipos entre los que las hipospadias son los más frecuentes, presentándose en 1 de cada 250-350 varones. 1 de cada 4500 bebés nace con ambigüedad genital severa, de hecho los DSD se corresponden con el 7,5% de todos los defectos de nacimiento. Además, los DSD están asociados a otros síndromes como el de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (caracterizado por la ausencia congénita del tercio superior de la vagina, útero y trompas de Falopio, y frecuentemente asociado con malformaciones renales) (Sultan et al. 2009) o el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (algunas de las manifestaciones clínicas incluyen: anomalías faciales, retraso mental, trastorno del crecimiento, alteraciones de los genitales externos en varones y múltiples malformaciones menores) (Porter 2008). Sin embargo, y a pesar de todos los avances que se han hecho en el conocimiento de la determinación sexual, se estima que solo se conoce la causa molecular de aproximadamente el 20% de los casos de DSD (Hughes et al. 2006), y hasta el 50% de los pacientes con disgenesia gonadal completa 46XY no obtienen un diagnóstico preciso.

Los DSD constituyen una preocupación pediátrica importante debido a la dificultad clínica del manejo de estas complejas condiciones y sus secuelas relacionadas con cáncer e infertilidad. Además, debe tenerse en cuenta los problemas de desarrollo físico y psicológico asociados, siendo necesaria la participación de un grupo multidisciplinar en el consejo y manejo de estos individuos para intentar minimizar en la medida de lo posible las repercusiones en su desarrollo vital (revisado en (Eggers et al. 2012)). En la tabla I1 se presenta un resumen con todos los genes más relevantes involucrados en el desarrollo testicular y ovárico en humanos y ratones y sus correspondientes fenotipos.

| Gen | Función | Fenotipo gonadal en ratón | Síndrome humano |
|---|-------------------------|---|-------------------------|
| Genes involucrados en el desarrollo de la gónada bipotencial | | | |
| Emx2 | Factor de transcripción | Emx2 ^{-/-} carece de riñones, uréteres, gónadas y tracto genital | No mutaciones descritas |
| Lhx9 | Factor de transcripción | Lhx9 ^{-/-} fallo en el desarrollo de la | No mutaciones descritas |

| | | | |
|---|---|---|--|
| gónada bipotencial | | | |
| M33/CBX2 | Factor de transcripción | Cbx-/- Reversión del sexo XY de macho a hembra Defecto del desarrollo ovárico en XX | DSD ovárico XY |
| Nr5a1 | Receptor nuclear/ Factor de transcripción | Nr5a1-/- fallo en el desarrollo de la gónada bipotencial | Síndrome de regresión testicular embrionario; disgenesia gonadal XY Fallo prematuro ovárico XX |
| Wt1 | Factor de transcripción | Wt1-/- fallo en el desarrollo de la gónada bipotencial | Síndromes de Denys-Drash, WARG y Fraiser |
| Genes involucrados en el desarrollo testicular | | | |
| Dhh | Molécula de señalización | Dhh-/- fallo en la formación de cordones testiculares debido al tejido peritubular anormal | LOF: XY disgenesia gonadal parcial o completa |
| Dmrt1 | Factor de transcripción | Dmrt1-/- fallo en el desarrollo testicular, pérdida de células de Sertoli y células germinales | Hemicigosis: XY disgenesia gonadal Deleción de 9p24 (incluyendo DMRT1): XY disgenesia gonadal (varios grados) |
| Fgf9 | Molécula de señalización | Fgf9-/- reversión del sexo XY de macho a hembra y fallo en el desarrollo de células de Sertoli | No mutaciones descritas |
| Fog2 | Cofactor de Gata4 | Fog2-/- niveles de Sry bajos, reversión del sexo XY de macho a hembra | Translocación incluyendo FOG2: XY hipogonadismo hipogonadotrópico combinado con defectos coronarios (CHD) |
| Gata4 | Factor de transcripción | Gata4-/- letal embrionario (E7-E9.5) | LOF: XY con genitales ambiguos o longitud del pene reducida |
| Map3k1 | Quinasa | No fenotipo gonadal | XY disgenesia gonadal parcial o completo |
| Map3k4 | Quinasa | Reversión del sexo XY de macho a hembra | No mutaciones descritas |
| Nr0b1 | Receptor nuclear | XY Fallo en la formación de los cordones testiculares y espermatogénesis (dependiendo del fondo genético) | LOF/deleciones: hipoplasia adrenal congénita Duplicaciones: XY disgenesia gonadal con cordones testiculares desorganizados e hipogonadismo hipogonadotrópico |
| Sox3 | Factor de transcripción | No fenotipo gonadal | Duplicación (incluyendo Sox3) y deleción por encima de Sox3: XX DSD testicular |
| Sox8 | Factor de transcripción | Sox8-/- fertilidad reducida Sox8-/-, Sox9-/- reversión del sexo XY con grado variable | No mutaciones descritas |

| | | | |
|--------------|-------------------------|---|--|
| Sox9 | Factor de transcripción | <p>Sox9^{-/-} reversión del sexo XY de macho a hembra</p> <p>Ods (deleción por encima de Sox9) reversión del sexo XX de hembra a macho</p> <p>Deficiente condicional: desarrollo de ovario XY</p> <p>Desarrollo testicular XX</p> | <p>LOF: XY disgénesis gonadal con displasia campomélica</p> <p>GOF: XX reversión del sexo de hembra a macho</p> <p>Duplicación incluyendo Sox9: DSD XX testicular</p> <p>Translocaciones por encima de Sox9: DSD ovotesticular XY</p> <p>Duplicación/triplicación por encima de Sox9: DSD testicular XX</p> <p>Deleción por encima de Sox9: DSD ovárico XY con displasia acampomélica campomélica, disgénesis gonadal, genitales externos femeninos o ambiguos</p> |
| Sox10 | Factor de transcripción | No fenotipo gonadal | Duplicación incluyendo SOX10 y otros genes: masculinización XY o feminización incompleta |
| Sry | Factor de transcripción | <p>Sry^{-/-} reversión de sexo XY de macho a hembra</p> <p>Translocación de Sry: reversión del sexo XX de hembra a macho</p> | <p>LOF: DSD ovárica XY</p> <p>GOF/translocaciones: DSD testicular XX</p> |

Genes involucrados en el desarrollo ovárico

| | | | |
|--------------------------|--------------------------|--|--|
| Ctnnb1/β-catenina | Factor de transcripción | Deficiente condicional en células de Sertoli XX similar a Wnt4 ^{-/-} y Rspo1 ^{-/-} | No mutaciones descritas |
| Foxl2 | Factor de transcripción | Foxl2 ^{-/-} fallo ovárico prematuro Folx2 ^{-/-} , Wnt4 ^{-/-} reversión del sexo XX de hembra a macho | BPES y fallo prematuro ovárico |
| Fst | Inhibidor de activina | Reversión parcial del sexo XX, formación de la vena celómica | No mutaciones descritas |
| Rspo1 | Molécula de señalización | Reversión parcial del sexo XX, similar a Wnt4 ^{-/-} y el deficiente condicional Ctnnb1 | Testicular XX y DSD ovotesticular Duplicación de 1p (incluyendo WNT4 y RSP01): disgénesis gonadal XY |
| Wnt4 | Molécula de señalización | XX agenesia de conductos de Müller, síntesis de testosterona y formación de la vena celómica | Duplicación de 1p (incluyendo WNT4 y RSP01): disgénesis gonadal XY LOF: XX agenesia de los conductos de Müller, síntesis de testosterona y formación de la vena celómica |

BPES: síndrome de blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso

GOF: mutación de ganancia de función

LOF: mutación de pérdida de función

WARG: tumor de Wilms-aniridia-malformación genitourinaria-retraso mental

Tabla I1. Genes implicados en el desarrollo de las gónadas en ratones y humanos y sus fenotipos asociados.





Objetivos



Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo es analizar la función de *Gadd45g* en el sistema inmunitario y estudiar su posible implicación durante el desarrollo embrionario en la determinación del sexo. Para ello se abordarán los siguientes objetivos:

1. Función de *Gadd45g* en el sistema inmunitario

- 1.1. Análisis del fenotipo inmunitario y patología de los ratones deficientes en *Gadd45g*.
- 1.2. Función de *Gadd45g* en la activación de células CD4: proliferación y muerte celular inducida por activación.
- 1.3. Papel de *Gadd45g* en la diferenciación y producción de citoquinas de las células T CD4 efectoras.
- 1.4. Análisis de la función de *Gadd45g* en el desarrollo de las células T. Selección tímica.

2. Papel de *Gadd45g* en el desarrollo embrionario

- 2.1. Análisis del fenotipo del aparato reproductor de ratones adultos deficientes en *Gadd45g*.
- 2.2. Estudio del efecto de la deficiencia de *Gadd45g* en las cepas mixta, 129/C57/BL/6, y pura, C57/BL/6.
- 2.3. Análisis de la expresión de *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Gadd45g* en las gónadas embrionarias.
- 2.4. Estudio de marcadores de desarrollo testicular en gónadas embrionarias.





Materiales y Métodos

1. Cepas de ratones.

Los ratones *Gadd45a*^{-/-}, *Gadd45b*^{-/-} y *Gadd45g*^{-/-} fueron generados por los Drs. J.M. Salvador y C. Hollander (Qi Cai 2006) (M. Christine Hollander et al. 1999) en un fondo mixto compuesto por las cepas 129Sv y C57BL/6. La delección de *Gadd45a*, *Gadd45b* o *Gadd45g* se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN extraído de cola de ratón. Los ratones se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología en condiciones de esterilidad. Los ratones *Gadd45a*^{-/-}, *Gadd45b*^{-/-} y *Gadd45g*^{-/-} puros se obtuvieron cruzando los ratones mixtos con la cepa pura C57BL/6 durante siete generaciones. Se cruzaron ratones *Gadd45a*^{-/-}, *Gadd45b*^{-/-} y *Gadd45g*^{-/-} entre sí para la obtención de ratones dobles y triples deficientes.

1.1. Extracción de ADN y genotipado de los ratones.

Para el genotipado de los ratones se cortó un fragmento de la cola de aproximadamente 0,5 cm de ratones recién destetados (alrededor de 21 días de edad). Las colas se mantuvieron a -20°C o se procesaron inmediatamente incubándolas en 100 µl de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH=8,5; EDTA 5 mM; SDS 0,2%; NaCl 200 mM) suplementado con proteinasa K (100 µg/ml, Roche). Esta solución se incubó durante la noche a 56°C. Al día siguiente se añadieron 300 µl de agua destilada. Para el genotipado de los ratones *Gadd45a*^{-/-}, *Gadd45b*^{-/-} y *Gadd45g*^{-/-}, se utilizó el método de la PCR. La mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 25 µl conteniendo 10 µl de Taq PCR Mix 2,5X (Sigma) y los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 1). Por último se añadieron 2 µl de ADN y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La mezcla se procesó en una máquina de PCR (iCycler, Bio-Rad) con el siguiente programa:

| | | |
|-------------|----------------------|-------------|
| | 1. Desnaturalización | 94°C, 3 min |
| Ciclo (x35) | 2. Desnaturalización | 94°C, 1min |
| | 3. Anillamiento | 58°C, 40 s |
| | 4. Elongación | 72°C, 3 min |
| | 5. Elongación | 72°C, 4 min |
| | 6. Pausa | 4°C |

La mezcla de reacción para el genotipado de SRY se preparó en un volumen total de 30 µl conteniendo 12 µl de Taq PCR Mix 2,5X (Sigma) y los oligonucleótidos correspondientes (Tabla M1). Por último, se añadieron a la reacción 2 µl de ADN y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La mezcla se procesó con el siguiente programa:

| | | |
|-------------|----------------------|-------------|
| | 1. Desnaturalización | 94°C, 3 min |
| Ciclo (x35) | 2. Desnaturalización | 94°C, 30 s |
| | 3. Anillamiento | 50°C, 30 s |
| | 4. Elongación | 72°C, 1 min |
| | 5. Elongación | 72°C, 4 min |
| | 6. Pausa | 4°C |

Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa (EuroClone) al 2% disuelta en tampón TAE 1X (para obtener TAE 1X, se diluyó en agua destilada TAE 50X: 242 g de Tris, 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M pH=8). Para poder visualizar el ADN en el gel, se añadió G-108 Safe View (abm) a una dilución 1:5. Cada muestra de ADN se mezcló con tampón de carga 6X (Ficoll 15%, xilencianol 0,25% azul de bromofenol 0,25%) y se cargó en el gel para su separación mediante electroforesis a 100V. También se cargó en el gel un patrón de pesos moleculares conocidos (100 bp Ladder, Favorgen). El ADN se visualizó con luz UV a 254 nm.

| Gen | Secuencia (concentración) | | Fragmento amplificado (bp) |
|----------------|---|---|----------------------------|
| Gadd45a | 5'-CCTCTGCTTACCTCTGCACAA-3' (1 µM) | 5'-GAAGACCTAGACAGCACGGTT-3' (0,5 µM) | wt (324) |
| | 5'-GCATGCTCCAGACTGCCTT-3' (1 µM) | 5'-GAAGACCTAGACAGCACGGTT-3' (0,5 µM) | delecionado (164-211) |
| | 5'-AGAACGAGATCAGCAGCCTCT-3' (0,5 µM) | | |
| Gadd45b | 5'-TGTGGAGCCAGGAGCAGCA-3' (0,5 µM) | 5'-GCAAGCGATCTGTCTTGCTCA-3' (1 µM) | wt (254) |

| | | | |
|----------------|--|--|---------------------------|
| | 5'-GCATGCTCCAGACTGCCTT-3' (0,5 μ M) | 5'-GCAAGCGATCTGTCTTGCTCA-3' (1 μ M) | delecionado (130) |
| Gadd45g | 5'-GCTGTGCTTTCCGGAAGTGA-3' (0,2 μ M) | 5'-GTGGGCTCTATGGCTTCTGA-3' (0,8 μ M) | wt (268) |
| | 5'-CCTGCCGCCTCATTGCA-3' (0,2 μ M) | 5'-GTGGGCTCTATGGCTTCTGA-3' (0,8 μ M) | delecionado (217) |
| SRY | 5'-TCTTAAACTCTGAAGAAGAGAC-3' (0,15 μ M) | 5'-GTCTTGCCTGTATGTGATGG-3' (0,15 μ M) | Macho 404bp Hembra (-) |

Tabla M1. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones. Se muestra la secuencia y la concentración (μ M) de cada oligonucleótido, así como el fragmento que amplifican del alelo correspondiente.

2. Citometría de flujo.

2.1. Estudio del fenotipo inmunológico.

Los ratones se sacrificaron en una cámara de hipoxia con CO₂. Se extrajeron los nódulos linfáticos, el bazo y el timo. Se mantuvieron a 4°C en medio completo RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con glutamina 4mM (Lonza), β -mercaptoetanol 0,5 μ M (Merck), penicilina/estreptomicina 100 U/ml (Lonza) y 10% de suero fetal bovino (FCS, EuroClone). Los órganos se disgregaron utilizando filtros de nylon de un tamaño de poro de 40 μ m (BD Falcon). Las suspensiones celulares se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm a 4°C y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS: fosfato sódico 10mM, pH 7,4; NaCl 150 mM). El número de células se calculó utilizando una cámara de Neubauer en el microscopio óptico.

Para el análisis de marcadores de la superficie celular se incubaron 5x10⁵ células en una placa de 96 pocillos con fondo en V (Nunc) con los anticuerpos conjugados con fluorocromos a la dilución apropiada (Tabla M2) en 30 μ l de PBS frío durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se procesaron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) inmediatamente o se fijaron con formaldehído 0,1% y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Se analizó un mínimo de 20.000 células por muestra excluyendo las células muertas. El análisis de los resultados se realizó usando el programa Cytomics (CXP).

| Anticuerpo | Conjugado | Compañía | Clon | Origen | Isotipo | Dilución |
|------------|-----------|---------------|----------|---------|----------|----------|
| B220 | PerCP | BD Pharmingen | RA3-6B2 | rata | IgG2a, κ | 1/200 |
| B220 | APC | B. Coulter | RA3-6B2 | rata | IgG2a, κ | 1/50 |
| CD3 | PerCP | Biolegend | 145-2C11 | hámster | IgG | 1ul |
| CD3 | APC | eBioscience | 145-2C11 | hámster | IgG | 1/50 |
| CD4 | APC | eBioscience | GK1.5 | rata | IgG2b, κ | 1/200 |
| CD4 | PerCP | Biolegend | GK1.5 | rata | IgG2b, κ | 1/100 |
| CD8a | FITC | B.Coulter | 53-6.7 | rata | IgG2a, κ | 1/50 |
| CD8a | PerCP | BD Pharmingen | 53-6.7 | rata | IgG2a, κ | 1/200 |
| CD25 | PE | BD Pharmingen | 7D4 | rata | IgG1, κ | 1/200 |
| CD44 | FITC | B. Coulter | KM201 | rata | IgG1, κ | 1/100 |
| CD44 | Biotina | BD Pharmingen | IM7 | rata | IgG2b, κ | 1/100 |
| CD95 | | | | | | |
| CD62L | APC | eBioscience | MEL-14 | rata | IgG2a, κ | 1/200 |
| CD62L | FITC | BD Pharmingen | MEL-14 | rata | IgG2a, κ | 1/200 |
| Foxp3 | FITC | eBioscience | FJK-16s | rata | IgG2a, κ | 1/50 |
| TCRαβ | FITC | BD Pharmingen | H57-597 | hámster | IgG2, λ1 | 1/100 |

Tabla M2. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo. Se muestra el fluorocromo conjugado, así como la compañía, clon, especie de origen, isotipo y dilución utilizada en cada caso. APC: alofocianina, FITC: fluoresceína, PE: ficoeritrina y PerCP: clorofila peridinina.

2.2. Citometría de flujo de las células T reguladoras.

Para estudiar la población de células Treg se hizo una primera tinción como se indica en el apartado 2.1 de los marcadores CD3-APC, CD4-PerCP y CD25-PE. Después se procedió a la tinción del marcador intracelular Foxp3 característico de las células Treg. En primer lugar se incubaron las células con 100 µl de la solución de fijación/permeabilización (eBioscience) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavó una vez con tampón de permeabilización (eBioscience), a continuación, se incubaron las células con el anticuerpo frente a Foxp3 conjugado con FITC (Tabla M2) en 100 µl de tampón de permeabilización durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con tampón de

permeabilización, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se procesaron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). Se analizó un mínimo de 10.000 células por muestra excluyendo las células muertas. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Cytomics (CXP).

3. Cultivos celulares y ensayos funcionales.

3.1. Obtención y cultivo de células T CD4+.

Se extrajeron los nódulos linfáticos y el bazo de cada ratón como se describe en el apartado 2.1. Se purificaron células T CD4+ mediante selección negativa con el kit Dynal Mouse CD4 Negative Isolation Kit (Invitrogen). Brevemente, se calcula el volumen de bolas necesario y se lavan con Buffer 1. Se añade, a 100 µl de suspensión celular (1×10^7 células), FCS inactivado y el mix de anticuerpos. Se incuba 20 minutos a 4°C. Se lavan las células con Buffer1 (PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementado con 0,1% de BSA y EDTA 2 mM). Se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Se resuspenden las células en Buffer1 y se añaden 200 µl de bolas lavadas. Se incuba la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se resuspende en 1 ml de Buffer1 y se coloca en el imán durante 2 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Se centrifuga y decanta. Finalmente, se resuspende en un volumen de medio completo adecuado. Las células purificadas se cultivaron en medio completo, a menos que se indique otra condición, en un incubador en condiciones estándar de humedad (95%), temperatura (37°C) y CO_2 (5%).

3.2. Ensayos de proliferación.

Se cultivaron 10^5 células de nódulos linfáticos o células T CD4+ purificadas en cada pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Nunc) y se estimularon con concentraciones crecientes de los siguientes mitógenos: anti-CD3 (αCD3) (BD Pharmingen), pegado a placa, Concanavalina A (ConA, SIGMA) e IL2 (obtenida y purificada del medio condicionado de linfocitos de ratón), ambos solubles. Para pegar a la placa, el anti-CD3 se resuspendió en PBS a la concentración deseada en cada caso y se incubó durante 1 hora a 37°C, posteriormente se lavó la placa con PBS 3 veces. Cuando las células se estimulan con anti-CD3, se añaden al medio $0,5 \times 10^5$ APCs por

pocillo (esplenocitos irradiados con una dosis de 20 Greys). Después de 48 h de activación con anti-CD3, solo o con IL2, o ConA, se añadió a cada pocillo 1 μ Ci de 3 H-timidina (Amersham Biosciences) y se mantuvieron en cultivo durante 16 h. Al final del ensayo, se filtraron las muestras en un harvester (Perkin Elmer) pasándolas a través de una membrana de fibra de vidrio (Wallac). Para evaluar la incorporación de timidina (representada por las cuentas por minuto: cpm), se sumergió la membrana en 5 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se analizó en un contador de centelleo (Trillux 1450 Microbeta, Wallac). Cada muestra se analizó por triplicado y se consideró la media como resultado final.

3.3. Ensayos de muerte celular.

Para el ensayo de muerte inducida por activación se cultivaron 5×10^5 células T CD4+ por pocillo, en una placa de 48 pocillos (Falcon), y se dejaron sin estímulo durante 24, 48, 72 y 96 horas. Por otro lado, se estimularon 5×10^5 células T CD4+ con anti-CD3 (5 μ g/ml), pegado a placa, en presencia de $2,5 \times 10^5$ APCs. Después de 48 h se re-estimularon con anti-CD3 (10 μ g/ml) o ConA soluble durante 24 o 48 horas. Finalmente, se recogieron las células, se lavaron con PBS frío y se fijaron con etanol al 70% a -20°C. Las muestras se conservaron a esta temperatura hasta el día del análisis.

El día del análisis se lavaron las células dos veces con PBS y se tiñeron con 1 ml de Ioduro de Propidio (IP, DNA prep Reagents Kit; Beckman Coulter) durante 30 minutos a 37°C. Se analizó un mínimo de 10.000 células por muestra, en un citómetro XL-MCL (Beckman Coulter) o en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.4. Diferenciación de células T CD4+ hacia Th1, Th2 y Th17 y ensayo de producción de citoquinas.

Para la diferenciación de células T CD4+ hacia células efectoras Th1, Th2 o Th17, se purificaron células T CD4+, según se explica en el apartado 3.1, y se cultivaron en medio completo 10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (Falcon) en la que previamente se había pegado anti-CD3 (10 μ g/ml) y anti-CD28 (5 μ g/ml).

Para las condiciones de diferenciación a Th1, se suplementó el medio con IL-12 (2 ng/ml, Sigma), IL-2 (10% del sobrenadante obtenido y purificado del medio

condicionado de linfocitos de ratón) y anti-IL-4 (10 µg/ml, clon 11B11, BD Pharmingen). Después de 5 días, se lavaron las células con PBS y se contaron. Para inducir la producción de citoquinas, se re-estimularon 10^5 células por pocillo durante 12 horas con anti-CD3 (5 µg/ml) solo o combinado con anti-CD28 (5 µg/ml), pegados a placa.

Para las condiciones de diferenciación a células Th2, el medio se suplementó con IL-4 (10 ng/ml, Sigma), IL-2 (10%) y anti-IL-12 (10 µg/ml, Sigma). Después de 5 días en cultivo, las células se lavaron y se contaron. Para inducir la producción de citoquinas, se re-estimularon 10^5 células por pocillo con anti-CD3 (5 µg/ml) pegado a placa durante 12 horas.

Para las condiciones de diferenciación a Th17, se suplementó el medio con TGFβ1 (3 ng/ml, R&D Systems), IL-6 (30 ng/ml, R&D Systems), anti-IL4 (10 µg/ml, clon 11B11, BD Pharmingen), anti-IL-12 (10 µg/ml, Sigma), IL-23 (20 ng/ml, R&D Systems), anti-IFNγ (10 µg/ml) e IL-2 (10%). Después de 5 días, se lavaron las células con PBS y se contaron. Para inducir la producción de citoquinas, se re-estimularon 10^5 células por pocillo durante 12 horas con anti-CD3 (5 µg/ml) solo o combinado con anti-CD28 (5 µg/ml), pegados a placa, o con una combinación de PMA (50 ng/ml) e ionomicina (10 µM).

Posteriormente, los sobrenadantes de cultivo se recogieron a las 12 horas para determinar la concentración de citoquinas producidas incubándolos con el kit de Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Immunoassay (Millipore). Este kit está formado por microesferas que llevan anclados dos fluorocromos distintos en diferente proporción. Así, la primera de las microesferas tendrá un 100% del primer fluorocromo y 0% del segundo, la segunda microesfera tendrá un 99% del primer fluorocromo y 1% del segundo, la tercera tendrá un 98% del primer fluorocromo y 2% y, así, sucesivamente. De este modo, al hacerlas pasar por una corriente de flujo, en un Luminex 100 IS, cada una es clasificada en función del patrón de fluorescencia. Además, cada microesfera lleva acoplado covalentemente un anticuerpo específico de la citoquina a medir. Este método permite analizar un número elevado de citoquinas, dentro de una misma muestra, en un volumen muy pequeño (25 µl). Se utilizó el estándar proporcionado por el kit como patrón de concentraciones desde 10.000

pg/ml hasta 3,2 pg/ml. Brevemente, en una placa de 96 pocillos (Millipore) se mezclan 25 µl del estándar o de la muestra, 25 µl tampón de ensayo (solo en las muestras), 25 µl de matriz de suero (antisuero) y 25 µl de la mezcla de microesferas. Se incubó durante la noche a 4°C, se lavó dos veces con tampón de lavado (proporcionado por el kit) y se añadieron 25 µl de la mezcla de anticuerpos específicos de cada citoquina. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, se añadieron 25 µl de estreptavidina-ficoeritrina y se volvió a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó dos veces con tampón de lavado y se añadieron 150 µl de fluido envolvente (Sheath fluid) y se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MFI) en el Luminex.

3.5. Análisis de la activación de células Th1 y Th2.

Parte de las células Th1 y Th2 diferenciadas se dejaron en reposo en el incubador durante la noche; posteriormente, se estimularon a una concentración de 3×10^6 células/ml con 5 µg/ml de anti-CD3 soluble durante distintos tiempos, usando como *crosslinker* anti-IgG1 (BD Pharmingen) a la misma concentración. Por último, se analizó la señalización de MAPK por western blot (wb) como se indica en el apartado 4.

3.6. Activación *in vitro* de timocitos.

Se extrajo el timo de ratones de 5 a 8 semanas de edad y se disgregó utilizando filtros de nylon de 40 µm. Los timocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de FCS, glutamina 4 mM, β-mercaptoetanol 0,5 µM y penicilina/estreptomicina 100 U/ml. Las células se dejaron en reposo a 37°C durante al menos 4 horas, después se concentraron y se activaron 3×10^6 células por ml con anti-CD3 soluble (0,5 o 10 µg/ml) en combinación con anti-IgG1 (0,5 o 10 µg/ml) durante 15, 30 o 60 minutos a 37°C. Posteriormente las células se recogieron, se lavaron con PBS frío, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una minicentrífuga 5417R Eppendorf y se lisaron inmediatamente para su posterior análisis por wb o se mantuvieron a -80°C hasta el día del análisis.

4. Preparación y análisis de proteínas por *western blot* (wb).

4.1. Preparación de extractos celulares totales.

Las células se lisaron con el tampón de lisis de Cell Signaling (tampón 1X: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 1%, pirofosfato sódico 2,5 mM, β -glicerofosfato 1mM, ortovanadato sódico 1mM y leupeptina 1 μ g/ml) a razón de 10 μ l por cada millón de células, centrifugando durante 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Se cuantificó, la cantidad de proteínas en el extracto utilizando el kit Micro BCA (Termo Scientific); este método utiliza el ácido bicinconínico (BCA) para la detección de Cu¹⁺, que se forma al reducirse el Cu²⁺ en un ambiente alcalino, de manera que el producto final de la reacción (dos moléculas de BCA con un ion Cu¹⁺) es de un color púrpura que se puede detectar midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En primer lugar, se mezclaron los reactivos A, B y C a razón de 50/49/1 y se incubaron 100 μ l de esta mezcla con 1 μ l de lisado en una placa de 96 pocillos con fondo plano (Nunc) durante 30 minutos a 37°C. A la vez, se incluyeron pocillos con concentraciones conocidas y crecientes de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Finalmente, se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas (Sunrise, Tecan).

4.2. Análisis de proteínas por wb.

Se preparó una cantidad igual de proteína de todas las muestras (siempre superior a 15 μ g) y se desnaturizó con tampón de carga 4X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 8%, glicerol 40%; Ditiotretitol 1 M; β -mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,1%) durante 5 minutos a 95°C. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) de 1 mm al 10% de acrilamida-bisacrilamida, preparado según el protocolo de Laemmli (Tabla M3), en tampón de electroforesis 1X (preparado diluyendo en agua destilada tampón 10X: Tris 24,8 mM; glicina 195 mM; SDS 10 %).

| | Gel de resolución | Gel de empaquetamiento |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| concentración final de acrilamida | 10% | 3,75% |
| acrilamida-bisacrilamida (29:1) | 3,333 ml | 0,625 ml |
| TrisHCl (0,5 M) | - | 1,25 ml |
| TrisHCl (1,5 M) | 2,5 ml | - |
| SDS (10%) | 0,1 ml | 0,05 ml |
| agua destilada | 3,567 ml | 2,825 ml |
| Persulfato amónico (1,5%) | 0,5 ml | 0,250 ml |
| TEMED | 0,004 ml | 0,004 ml |
| volumen final | 10 ml | 5 ml |

Tabla M3. Composición de los geles de poliacrilamida de concentración y de resolución.

La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Mini Protean II (Bio-Rad) a 100-120 V durante 1-1,5 horas. Para estimar el peso molecular de las proteínas, se utilizó un marcador de pesos conocidos, comprendidos entre 12 y 225 kDa (Full-Range Rainbow Marker, Amersham).

El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), previamente sumergida en metanol (Merck), con un aparato de electro-transferencia en semiseco (BioRad). Para la transferencia, se preparó un “sándwich” consistente en un papel Extra Thick (Bio-Rad), la membrana de PVDF, el gel y otro papel Extra Thick, todo previamente sumergido en tampón de transferencia 1X (preparado diluyendo en agua destilada tampón 10X: Tris 30 g; glicina 144 g; SDS 10%; y añadiendo metanol 20%). Después de transferir durante 1 hora a 12 V, la membrana se lavó con TBS/T (tampón Tris salino: Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM añadiendo Tween20 0,05%) durante 5 minutos y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS/T/leche en polvo desnatada (5%, Central lechera asturiana). Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS/T, la membrana se incubó con diferentes anticuerpos primarios (Tabla M4) diluidos en TBS/T/BSA (1%) durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.

| Anticuerpo | kDa | secundario | compañía | dilución |
|-----------------|-------|------------|----------------|----------|
| β -actina | 40 | ratón | abcam | 1/2000 |
| p-ERK1/2 | 44/42 | conejo | Cell signaling | 1/500 |
| p-JNK1/2 | 46/54 | ratón | Cell signaling | 1/500 |
| p-p38 | 38 | conejo | Cell signaling | 1/500 |

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el análisis por wb de la señalización celular. Se muestra el tamaño (kDa) de la proteína que reconocen, la especie en la que se han producido, así como la compañía y la dilución a la que se utilizan.

Después de 3 lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (Horseradish peroxidase, DAKO cytomation) diluido (1:2.000) en TBS/T/leche (5%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana otras 3 veces y se reveló el resultado con el kit Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer) mezclando volúmenes iguales de los dos reactivos (Enhanced luminol reagent y Oxidizing reagent), la mezcla se aplicó sobre la membrana durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se secó el exceso de líquido con papel de filtro, se expuso a una película (Konica Minolta) en oscuridad y se procesó en una máquina de revelado Kodak X-OMAT.

Las mismas membranas se reutilizaron para la detección de distintas proteínas con anticuerpos, producidos en las mismas o en otras especies. Para eliminar restos de anteriores anticuerpos se utilizó la solución comercial Re-Blot Plus (Chemicon) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después se lavó la membrana y se volvió a bloquear.

5. Obtención de embriones.

Para la obtención de embriones de una determinada edad, se cruzaron hembras wt o *Gadd45g*^{-/-} con machos wt o *Gadd45g*^{+/-}, respectivamente. Se tomó como 0.5 dpc el día de detección del tapón vaginal (indica que ha tenido lugar una cópula). Para una determinación más exacta de la edad del embrión se contó el número de somitos de la

cola (Tabla M5) por detrás del primordio del miembro posterior (Hacker et al. 1995) (Figura M1).

| Somitos de la cola | 8 | 15-16 | 17-18 | 20-21 | 24-25 | 26-27 | 28-29 | 30 |
|--------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Dpc | 10.5 | 11.25 | 11.5 | 11.75 | 12 | 12.25 | 12.5 | 12.75 |

Tabla M5. Relación entre el número de somitos de la cola y la edad del embrión.

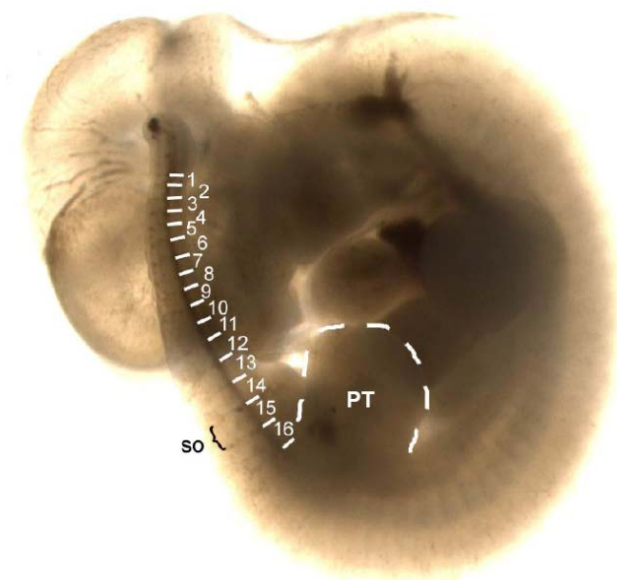


Figura M1. Representación del conteo de somitos de la cola para establecer la edad embrionaria. SO: somitos de la cola; PT: primordio miembro posterior.

Para el genotipado de los embriones, se utilizó el saco vitelino o una parte del cuerpo del embrión siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.1.

5.1. Obtención de las gónadas embrionarias.

La disección se llevó a cabo a medio día de la edad esperada desde la detección del tapón vaginal. Las hembras preñadas fueron sacrificadas con en una cámara de hipoxia CO₂. Se extrajo el útero conteniendo los embriones y se colocó en PBS. Se cortó el útero de forma que los embriones quedaran aislados individualmente, rodeados por su placenta y por parte del útero. Cada embrión así aislado se colocó en una placa Petri

estéril y se procedió a su extracción para evitar contaminaciones con material de embriones adyacentes. Se extrajeron las gónadas, junto con el mesonefros, y se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 1 hora; posteriormente, se lavaron con PBS y se guardaron en metanol a -80°C o se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para extracción de ARN (Li et al. 2012).

6. Análisis histológico.

Para el análisis histológico, se obtuvieron ovarios y testículos de ratones adultos. Se fijó el tejido en formalina al 10% durante una noche, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, lavados en xileno y, finalmente, incluidos en parafina en una máquina de parafinado Leica TP 1020. El tejido embebido en parafina fue cortado en secciones de 5 μm y procesado para una tinción con hematoxilina/eosina. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina/eosina y fueron analizadas al microscopio (Olympus Vanus AHBS3) por la Dra. Juana Flores (Universidad Complutense de Madrid).

7. Tinción de gónadas completas.

Las gónadas guardadas en metanol a -80°C fueron rehidratadas en concentraciones decrecientes de metanol (70%, 50%, 30%) 5 minutos en cada concentración y lavadas con TBS 1x tres veces. Posteriormente, se bloquearon en tampón de bloqueo (TBS-Tween 0.5% + 10% suero de burro) 1 hora. Se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente de la tabla 6 durante la noche en buffer de bloqueo. Se lavaron tres veces en TBS-T 0.5%. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo durante la noche en buffer de bloqueo (Tabla M6). A la mañana siguiente, se lavaron tres veces con TBS-T 0.5%. Finalmente, se montaron con Vectashield Hardset (Source). Las secciones fueron analizadas usando un microscopio confocal TCS SP5 y el software de imagen LAS AF.

| Anticuerpo | Casa comercial | Origen | Concentración | Fluorocromo |
|----------------------|-------------------|--------|---------------|-------------|
| Anti-Sox9 (sc 20095) | Santa Cruz | conejo | 1:50 | |
| Anti-AMH (sc 6886) | Santa Cruz | cabra | 1:100 | |
| Pecam-1 | Pharmingen | rata | 1:50 | FITC |
| Ac secundario | Life Technologies | burro | 1:500 | Alexa-647 |
| Ac secundario | Life Technologies | burro | 1:500 | Alexa-546 |

Tabla M6. Anticuerpos utilizados en la tinción de gónadas completas.

8. Hibridación *in situ* de gónadas completas.

8.1. Generación de las sondas.

Se extrajo ARN del embrión completo siguiendo el protocolo del Kit RNeasy Micro (apartado 9). A partir de este ARN se generó el ADN complementario (ADNc) de los genes de los que se van a generar sondas usando los primers que se describen en la Tabla M7.

| Gen | Tamaño sonda | Primers |
|----------------|--------------|---|
| <i>Gadd45a</i> | 500 | 5'-TGGTGACGAACCCACATTCA-3'(for) |
| | | 5'-ATTTAGGTGACACTATAGTTGAGGGCATAAAGACCAAA-3'(rev) |
| <i>Gadd45b</i> | 1069 | 5'-TTGCCTCTTGGGTTCGTATC-3'(for) |
| | | 5'-ATTTAGGTGACACTATAGCAAGCGATCTGTCTTGCTCA-3'(rev) |
| <i>Gadd45g</i> | 922 | 5'-CCTCCGCACTCTTTTGGATA-3'(for) |
| | | 5'-ATTTAGGTGACACTATAGCAGTCGGCTAAGTCCAGCTC-3'(rev) |

Tabla M7. Primers específicos para la generación de ADNc a partir de ARN de un embrión completo de 10.5 dpc.

En la generación del ADNc, también se incorpora la secuencia de reconocimiento de la polimerasa Sp6 (SP6 RNA Polymerase, Roche), necesaria para la generación de la sonda marcada con DIG. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems GenAmp PCR System 2700 siguiendo la mezcla de reacción el protocolo

que se detalla a continuación (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq, Invitrogen).

| Componentes | Volumen/50 μ l | Concentración final |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| Mix de reacción 2x | 25 μ l | 1X |
| ARN | x μ l | 10 pg – 1 μ g |
| Primer Sense (10 μ M) | 1 μ l | 0.2 μ M |
| Primer Anti-sense (10 μ M) | 1 μ l | 0.2 μ M |
| Mix RT/ Platinum(R) Taq | 1 μ l | — |
| Agua destilada hasta | 50 μ l | — |

| | Temperatura $^{\circ}$ C | Tiempo |
|--|--------------------------|---------|
| Síntesis de ADNc y pre-desnaturalización | 50 | 30 min |
| | 94 | 2 min |
| | 94 | 15 s |
| PCR (40 ciclos) | 55 | 30 s |
| | 72 | 1.5 min |
| Extensión final | 72 | 10 min |

Se comprobó la generación de los fragmentos de ADN esperados corriendo un gel de agarosa al 2% teñido con G108 y se observó que aparecía una sola banda del tamaño esperado para cada sonda.

Se generaron sondas marcadas con DIG (DIG RNA labeling mix, 10x con. Roche) siguiendo el protocolo que se detalla a continuación durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C.

| Componente | Volumen μ l |
|------------------------------------|-----------------|
| 100-200 ng de producto de PCR | X |
| Mix de marcaje de ARN con DIG 10x | 2 |
| Tampón de transcripción 10x | 2 |
| Polimerasa de RNA SP6 20U/ μ l | 2 |
| RNasin | 0,5 |
| Agua libre de ARN hasta | 20 |

Se eliminó el ADN añadiendo DNase I durante 15 minutos a 37°C. La reacción se paró añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M (pH 8.0). Las sondas obtenidas se purificaron usando el Kit RNeasy Micro (Qiagen).

8.2. Hibridación *in situ*.

Las gónadas conservadas en metanol 100% son rehidratadas en pasos consecutivos de 10 minutos en metanol 75%, 50% y finalmente en PBT 1x (PBS-Tween20). Las gónadas se blanquean con agua oxigenada al 6% durante una hora a temperatura ambiente.

Para permitir el acceso de la sonda al tejido, las gónadas se incubaron con proteinasa K durante 1 minuto, parando la reacción con glicina. Las gónadas se lavaron con PBT 5 minutos dos veces y fijadas con PFA 4%-glutaraldehído 0,25% durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se lavaron dos veces en PBT 5 minutos con agitación. Se incubaron con tampón de prehibridación para bloquear las uniones inespecíficas durante 2 horas a 65°C en agitación. Se incubaron con la sonda durante la noche a 65°C en agitación. A continuación, se retiraron las sondas y las gónadas se lavaron con tampón de posthibridación I (preparado en el momento) durante 3 minutos a 65°C dos veces. Se lavaron con tampón de posthibridación II (preparado en el momento) durante 30 minutos 2 veces a 65°C en agitación. Se lavaron con TBS durante 10 minutos 3 veces. Se bloquearon las uniones inespecíficas a DIG con solución de bloqueo. Las gónadas se incubaron durante la noche con anticuerpo anti-DIG en solución de bloqueo a 4°C. Se lavaron las gónadas a fondo con TBST (TBS-Tween20) haciendo cambios del tampón cada hora durante 5 horas y se dejaron lavando durante la noche a 4°C y en agitación. Se acondicionaron las gónadas y se eliminó la actividad de la fosfatasa alcalina endógena con NTMT (NaCl 100 mM, Tris-Cl pH 9,5 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween20 1%) durante 10 minutos tres veces. Se reveló con BM-Purple a temperatura ambiente y en agitación durante el tiempo necesario para el desarrollo de color. Finalmente, se fijaron con PFA 4% y se almacenaron a 4°C.

9. PCR cuantitativa.

Se extrajo el RNA de las gónadas (incluyendo el mesonefros) de embriones siguiendo las especificaciones del Kit RNeasy Micro (Qiagen). Brevemente, se disgregaron las gónadas de cada embrión en Buffer RLT (buffer de lisis suministrado en el kit). El lisado es homogeneizado pasando el lisado al menos cinco veces por una jeringuilla con una aguja de 0,9 mm. Se añade un volumen de etanol al 70% al lisado y se deposita en una minicolumna de centrifugación (suministrada con el kit). Se centrifuga a $\geq 8000 \times g$ y se descarta el sobrenadante. Se lava la minicolumna con buffer RW1 (suministrado con el kit) centrifugando 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Se trata la membrana de la minicolumna, que contiene los ácidos nucleicos con DNase I en buffer RDD (suministrado con el kit) para eliminar los restos de ADN. Se vuelve a lavar con buffer RW1. Se lava la minicolumna con buffer RPE (suministrado con el kit) y, posteriormente con etanol al 80%. Se centrifuga la minicolumna con la tapa abierta durante 5 minutos para secar la membrana a $\geq 8000 \times g$. Finalmente, se colocan sobre la membrana 14 μ l de agua libre de RNasas (suministrada con el kit) y se centrifuga durante 1 minuto para eluir el ARN en un volumen final de 12 μ l.

Se sintetizó el ADNc con 100 ng de RNA usando el Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription con RNase Inhibitor (Applied Biosystems). La cantidad de *Sry* y de *Gadd45g* fue cuantificada usando el ensayo de expresión de genes de Taqman Mm00441712_s1 para *Sry* y Mm00442225-m1 para *Gadd45g* (Applied Biosystems) en un termociclador MWG AG BIOTECH Primus 96. Todos los resultados fueron normalizados respecto al gen 18s (Fwd: 5'-GAGAAACGGCTACCACATCC-3'; RV: 5'-GGGTCGGGAGTGGGTAAT-3'). Como controles negativos se usaron muestras de machos previas a la retrotranscripción y muestras de ADNc de hembras.

10. Análisis estadístico.

Se realizó la prueba t de Student de dos colas para calcular la significación estadística de los datos. Ésta se consideró significativa a partir de $p < 0,05$ (*).



Resultados



1. *Gadd45g* en el sistema inmunitario.

1.1. Caracterización de los ratones deficientes en *Gadd45g*.

El modelo murino deficiente en *Gadd45g* fue generado por los doctores J.M. Salvador y C. Hollander en un fondo genético mixto entre las cepas 129J y C57BL/6 como se describe en (Johnen et al. 2013).

La generación de ratones deficientes en *Gadd45g* permite explorar en profundidad el papel de este gen en el sistema inmunitario. Los datos publicados sobre *Gadd45g* indican su papel fundamental en el mantenimiento del sistema inmunitario y en la repuesta del mismo, y una mayor comprensión de su función podría ayudar en la prevención o tratamiento de diversas patologías.

Los ratones *Gadd45g*^{-/-} no presentan síntomas clínicos asociados de enfermedad durante su vida. Tanto machos como hembras deficientes en *Gadd45g* tienen una vida similar a la de los ratones control (wt) (Figura R1). Las hembras deficientes en *Gadd45g* son fértiles, como también lo son los machos heterocigotos. Sin embargo, los ratones machos deficientes en *Gadd45g* son estériles.

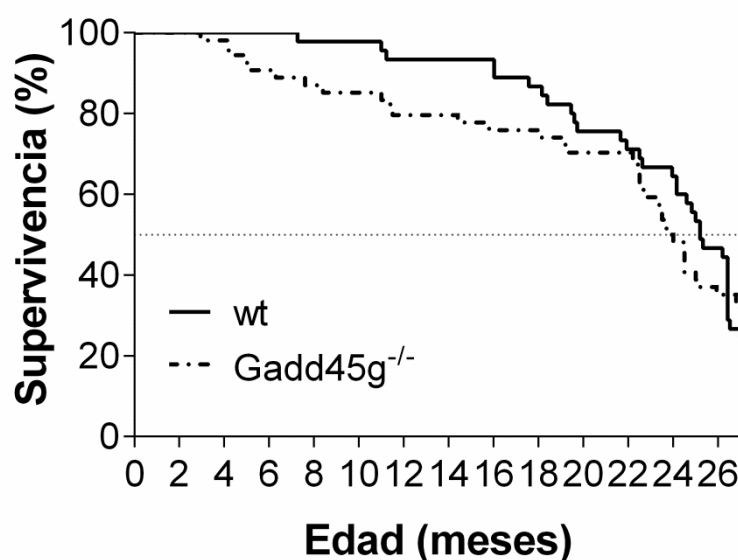


Figura R1. Curva de supervivencia de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt durante 30 meses. Gráfica de Kaplan Meier de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt. Los ratones *Gadd45g*^{-/-} tienen una vida media similar a los ratones wt. Se representa el porcentaje de ratones vivos. Animales de este estudio: wt n = 45 y *Gadd45g*^{-/-} n = 54.

1.2. Caracterización del fenotipo inmunológico.

Se analizaron las distintas poblaciones del sistema inmunitario mediante citometría de flujo y anticuerpos específicos frente a marcadores celulares. Para ello, se estudiaron células de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} jóvenes, de 4 a 8 semanas, y ratones adultos, de entre 6 y 12 meses, tanto macho como hembras. Estas edades nos permitieron analizar la evolución del sistema inmunitario con la edad.

En primer lugar, se estudiaron las poblaciones celulares de nódulos linfáticos, bazo y timo ya que son los principales órganos del sistema inmunitario. Los nódulos linfáticos y el bazo permiten el estudio del sistema inmunitario periférico y, el timo el estudio de la generación de los linfocitos T.

Se observó un aumento en el número de células presentes en los nódulos linfáticos de los ratones *Gadd45g*^{-/-} de 6-12 meses respecto de los wt ($51,6 \pm 6,7 \times 10^6$ vs. $34,7 \pm 4,5 \times 10^6$ células). En el bazo no se observaron diferencias significativas ni en el tamaño ni en el número de células entre ambos genotipos. Sin embargo, en el timo de ratones, de 4-8 semanas, deficientes en *Gadd45g* se observó un mayor número de células respecto de los wt ($320 \pm 43,8 \times 10^6$ vs. $197 \pm 29,3 \times 10^6$ células) (Figura R2).

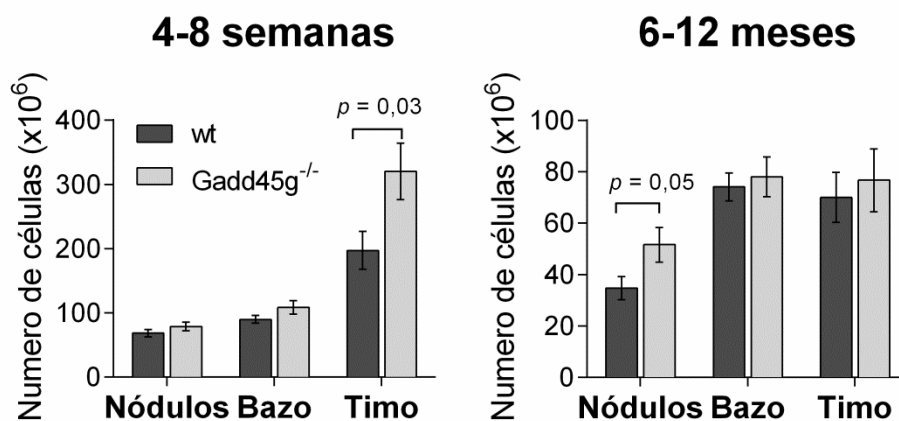


Figura R2. Número de células de nódulos linfáticos, bazo y timo de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt. Se obtuvieron los nódulos linfáticos (12 nódulos linfáticos: maxilares, axilares, inguinales y mesentérico), bazo y timo de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt, se disgregaron y se contó con el microscopio óptico el número de células mediante una cámara de Neubauer. Se representan los valores de la media \pm error estándar de la media (sem), $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Se estudió si la ausencia de *Gadd45g* tenía incidencia en las distintas poblaciones celulares de órganos linfáticos primarios y secundarios. Para ello, se analizaron, por citometría de flujo, las distintas poblaciones de linfocitos T (mediante los marcadores CD3, CD4 y CD8) y linfocitos B (mediante el marcador B220). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células T ni en nódulos linfáticos, ni en bazo. La ausencia de *Gadd45g* ocasionó una ligera disminución en el porcentaje de células B en los nódulos linfáticos de ratones de 4-8 semanas respecto de los wt ($21,1 \pm 1,9$ vs. $25,8 \pm 1,2\%$) (Figura R3).

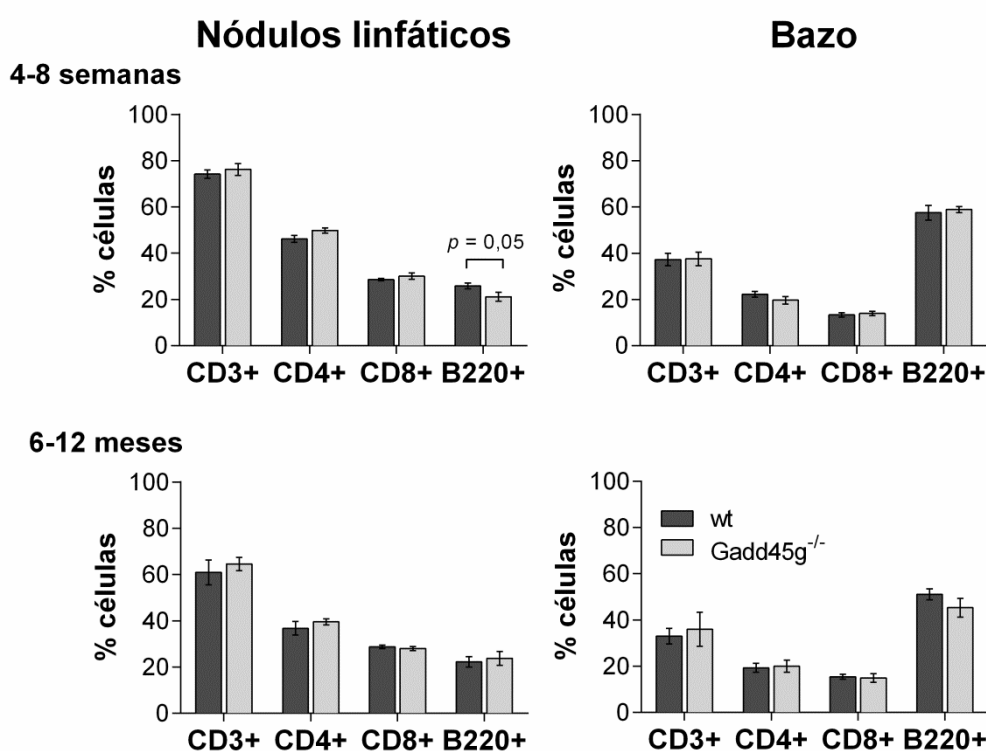


Figura R3. Porcentaje de células T, CD3+, CD4+, CD8+ y células B (B220+) presentes en nódulos linfáticos y bazo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-}. Se observó una disminución en el porcentaje de células B en nódulos linfáticos de ratones de 4-8 semanas. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; t de Student.

Se estudió el porcentaje de células activadas, linfocitos T reguladores y células de memoria en bazo y nódulos linfáticos. Estas poblaciones sufren cambios con la edad y suelen estar alteradas en procesos autoinmunes. Mediante citometría de flujo, se

analizaron las poblaciones de células activadas, tanto con activación tardía (CD25+) como temprana (CD69+) (Figura R4), células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) (Figura R5) y células de memoria, tanto efectora (CD44^{alto} CD62L^{bajo}) como central (CD44^{alto} CD62L^{alto}) (Figura R6).

Dentro de las poblaciones activadas (CD25+ y CD69+), se observó una distribución similar entre los ratones *Gadd45g*^{-/-} y los ratones wt. Se apreció un pequeño aumento en el porcentaje de las células con activación tardía en las células CD8+ en los nódulos linfáticos de los ratones *Gadd45g*^{-/-} de 4-8 semanas respecto de los wt ($0,7 \pm 0,08$ vs. $1,13 \pm 0,22\%$) (Figura R4).

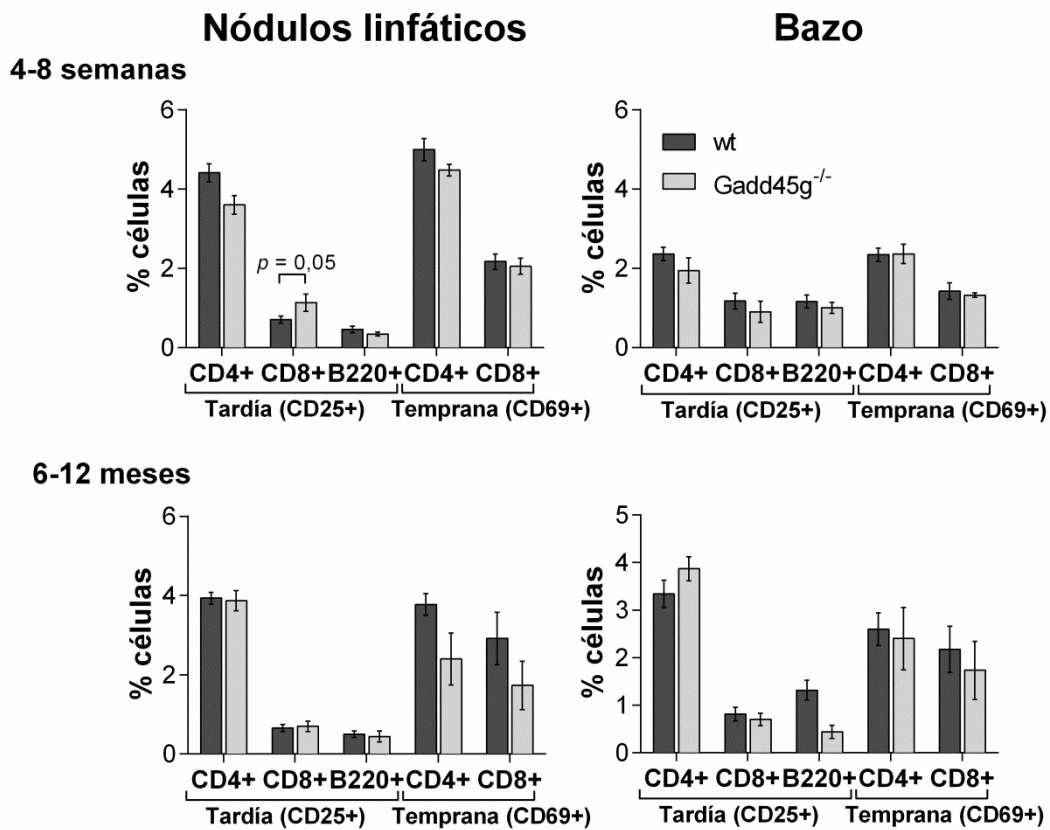


Figura R4. Porcentaje de células T activadas, por activación temprana (CD69+) o por activación tardía (CD25+). Se observa un incremento en las células CD8+ con activación tardía en los ratones *Gadd45g*^{-/-} respecto de los wt. No se observaron diferencias en el resto de las poblaciones. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Para la caracterización de las células T reguladoras, además del marcaje de moléculas de superficie, se realizó un marcaje intracelular del factor de transcripción característico de esta subpoblación celular, Foxp3. El porcentaje de las células T reguladoras está disminuido tanto en nódulos linfáticos como en el bazo de ratones deficientes en *Gadd45g* de 4-8 semanas (nódulos linfáticos: $2,1 \pm 0,1\%$; bazo: $0,7 \pm 0,1\%$) respecto de los wt (nódulos linfáticos: $2,9 \pm 0,1\%$; bazo: $1,3 \pm 0,1\%$). Sin embargo, esta diferencia desaparece en los ratones de 6-12 meses (Figura R5).

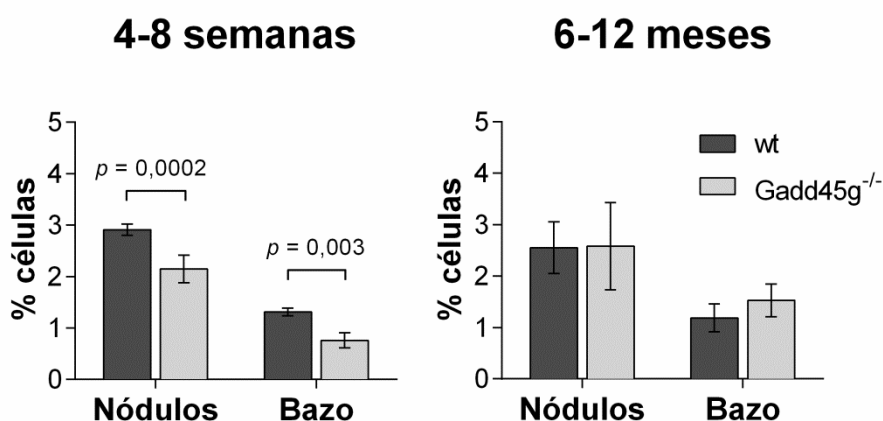


Figura R5. Porcentaje de linfocitos T reguladores (CD3+CD4+CD25+Foxp3+) presentes en nódulos linfáticos y bazo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-}. Se observa una disminución en el porcentaje de LT reguladores en los ratones de 4-8 semanas deficientes en *Gadd45g* respecto de los ratones wt. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Al estudiar las poblaciones de memoria, se encontró una disminución en el porcentaje de células que expresan el marcador de memoria CD44^{alto} en superficie en los ratones deficientes en *Gadd45g*. Esta disminución es significativa en las células CD4+ de los nódulos linfáticos de los ratones en los dos grupos de edad estudiados (CD44+CD4+ en nódulos linfáticos: $6,7 \pm 0,9$ vs. $3,6 \pm 0,3\%$ y en bazo: $7,1 \pm 0,7$ vs. $4,8 \pm 0,1\%$). También se observó una disminución en el porcentaje de CD44+ de las células que expresan B220+ en nódulos linfáticos de ratones de 4-8 semanas y en bazo de ratones de 6-12 meses (CD44+B220+ en bazo: $5,9 \pm 0,9$ vs. $4,1 \pm 0,2\%$) (Figura R6).

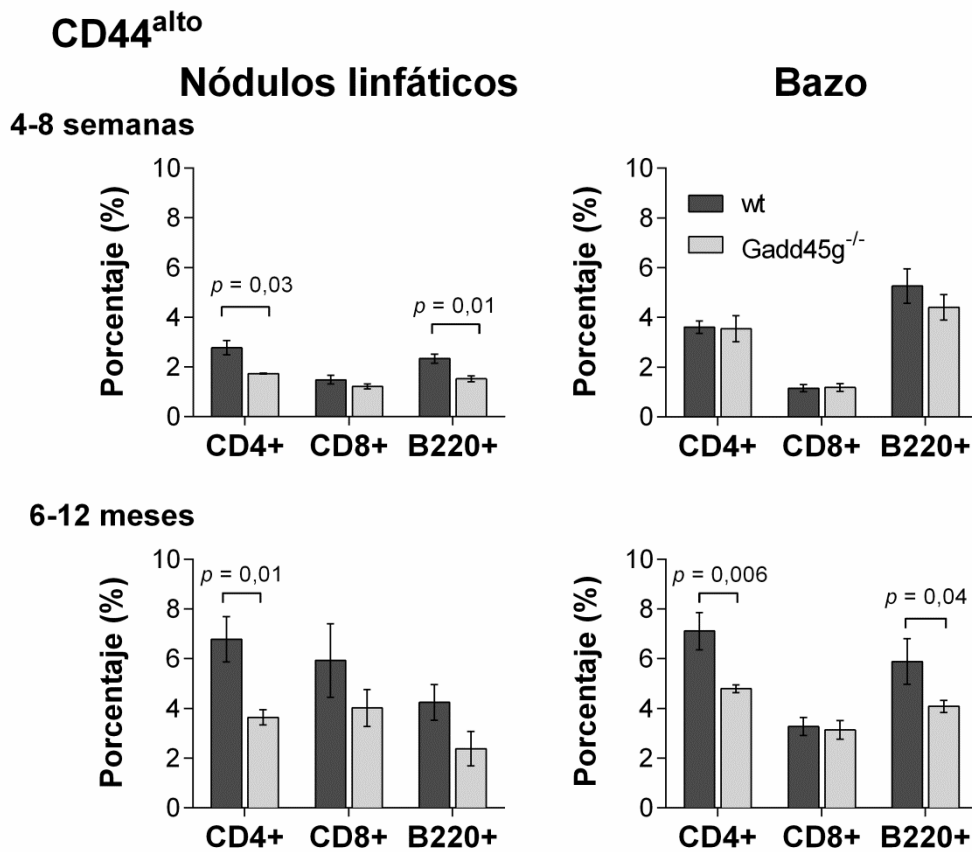


Figura R6. Porcentaje de células T y B que expresan CD44^{alto} en nódulos y bazo de ratones wt y Gadd45g^{-/-}. Se observa una disminución en el porcentaje de las poblaciones CD4+ y B220+ tanto en bazo como en nódulos linfáticos de ratones Gadd45g^{-/-}. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Al estudiar las poblaciones de memoria en más detalle, se observó una disminución en la memoria efectora (CD44^{alto}CD62L^{bajo}) en células CD4+ en ratones de 6-12 meses de edad ($Gadd45g^{-/-} = 1,2 \pm 0,2$ vs. wt = $2,1 \pm 0,3\%$) (Figura R7).

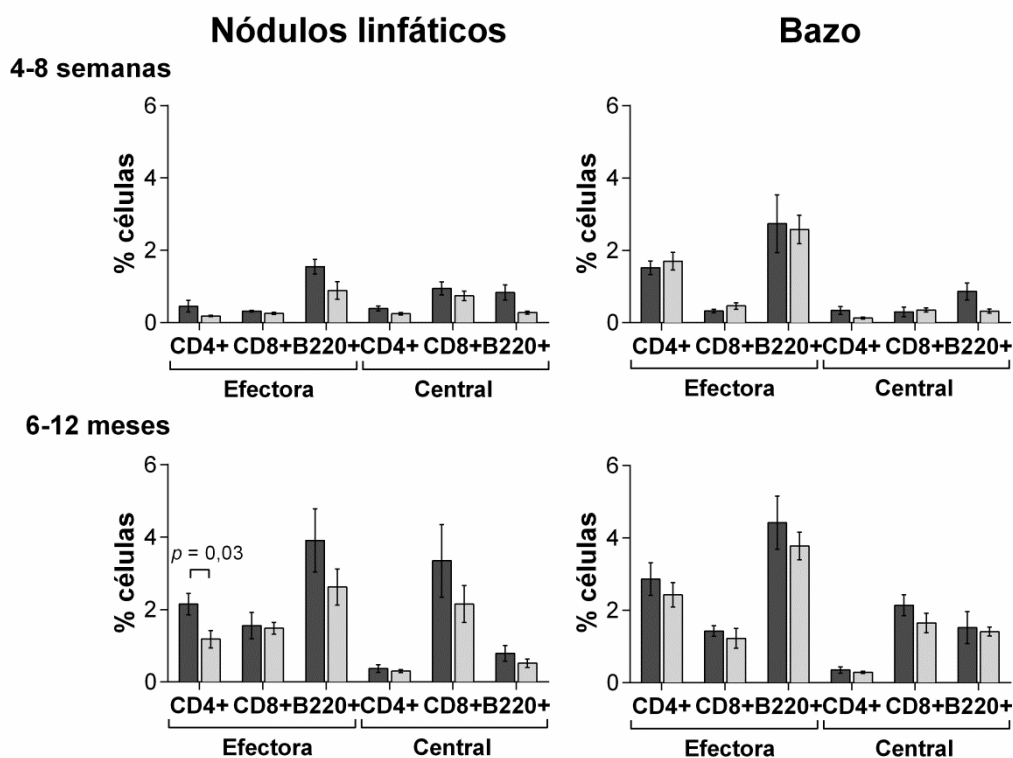


Figura R7. Porcentaje de células de memoria central ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}CD25^{-}$) y efectora ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{bajo}}CD25^{-}$) presentes en nódulos linfáticos y bazo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-}. No se observan diferencias entre ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} en las poblaciones de memoria de ratones de 4-8 semanas. Se observó una disminución en la memoria efectora de las células CD4⁺ en nódulos linfáticos de ratones de 6-12 meses. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Se estudió la expresión de CD95 (conocida también como FAS), una molécula implicada en la muerte de las células T cuando ya no son necesarias tras una respuesta inmunológica y en el mantenimiento de la homeostasis. El estudio de la expresión de CD95 en ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} reveló que la ausencia de *Gadd45g* no afecta su expresión (Figura R8).

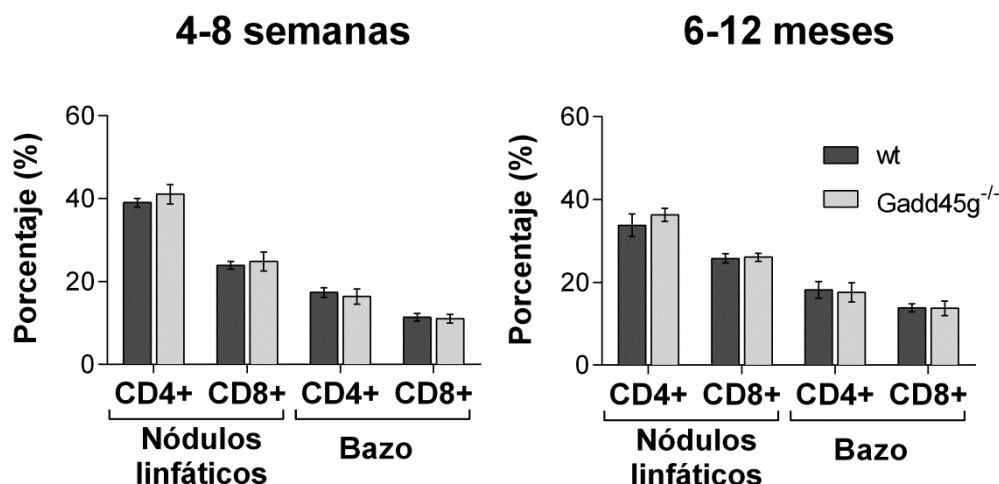


Figura R8. Porcentaje de células que expresan el marcador de superficie CD95 presentes en nódulos linfáticos y bazo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-}. No se observan diferencias en el porcentaje de células que expresan este marcador en ninguno de los grupos de edad ni en ninguno de los órganos examinados. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

1.3. Caracterización de las poblaciones celulares tímicas

El timo es el órgano donde se generan los linfocitos T. Aquí tienen lugar los procesos de selección negativa y positiva que permiten que solo aquellos linfocitos que han ordenado correctamente su TCR y que no son autorreactivos lleguen al torrente sanguíneo para ejercer su función. La ausencia de otro miembro de la familia *Gadd45*, *Gadd45a*, provoca una hiperplasia de timo; sin embargo, para *Gadd45g* no se ha descrito ninguna función en el desarrollo tímico. Así, se analizó en detalle si la ausencia de *Gadd45g* podía afectar al desarrollo del timo.

Se observó un mayor número de células en el timo de los ratones *Gadd45g*^{-/-} de 4-8 semanas ($320 \pm 43,8 \times 10^6$ células) respecto de los ratones wt ($197 \pm 29,3 \times 10^6$ células). Sin embargo, el timo involuciona de una manera similar a los wt llegando a un tamaño y número celular similar entre los 6-12 meses (*Gadd45g*^{-/-}: $76,7 \pm 12,2 \times 10^6$ vs. wt: $70 \pm 9,7 \times 10^6$ células) (Figura R9).

Se estudiaron las principales poblaciones tímicas formadas por las células que no expresan los marcadores CD4 ni CD8, las células dobles negativas (DN), poblaciones

que expresan ambos marcadores, las células dobles positivas (DP), y linfocitos simples positivos (SP), CD4+ o CD8+ *naïve*, que abandonarán el timo. No se observaron diferencias ni en células SP CD4+, CD8+, DP o DN en los ratones de 4-8 semanas; sin embargo, se observó un aumento del porcentaje de las células SP CD4+ (*Gadd45g*^{-/-}: 16,6±0,8 vs. wt: 13,4±0,6%) y una disminución de la DP (*Gadd45g*^{-/-}: 36,2±1 vs. wt: 38.7±0,6%) (Figura R9).

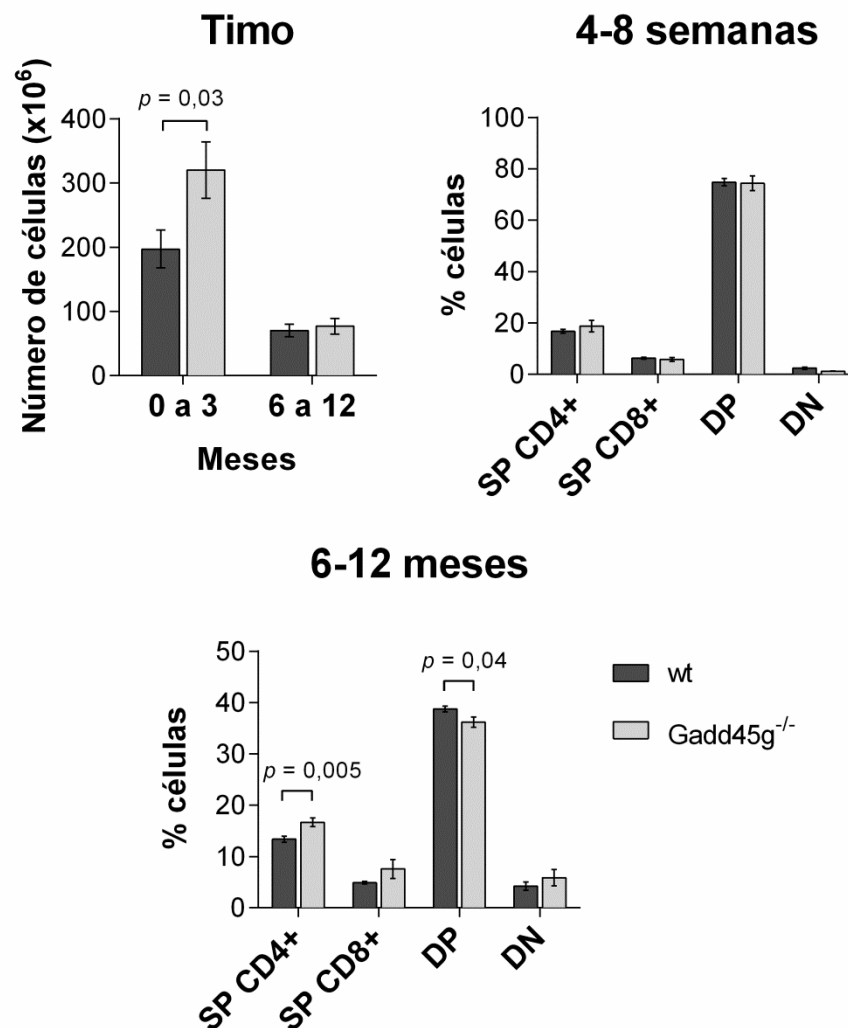


Figura R9. Número de células y principales poblaciones presentes en el timo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-}. Se observa un mayor número de células en los timos de ratones de 4-8 semanas respecto de los wt. En los ratones de 6-12 meses se aprecia un aumento en el porcentaje de células SP CD4+ y una disminución en el porcentaje de células DP. Se representan los valores de la media ± sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

Durante la fase de timocitos DN, se lleva a cabo la reordenación de la cadena beta del TCR. Este es un proceso clave de generación de LT puesto que si no se da una correcta ordenación de esta cadena el timocito no puede seguir desarrollándose y muere. La β -selección se da sobre las DN1 a DN3 (Carpenter et al. 2010). Para analizar con más detalle estas poblaciones de timocitos DN, se realizó un marcaje con CD44 y CD25, que permite una clasificación en DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) y DN4 (CD44-CD25-). No se observaron alteraciones de estas poblaciones en ninguno de los grupos estudiados (Figura R10).

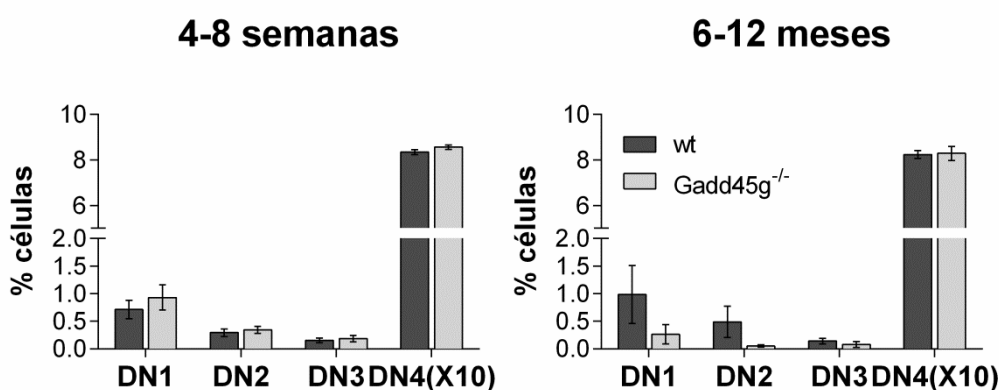


Figura R10. Poblaciones de células DN presentes en el timo. No se observan diferencias en estas poblaciones en los ratones Gadd45g^{-/-} respecto de los wt. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

1.4. Estudio de *Gadd45g* en la función de las células CD4.

1.4.1. *Gadd45g* en la proliferación de células CD4+.

Se analizó si la ausencia de *Gadd45g* podría afectar a las funciones básicas de las células T. Para evaluar el papel de *Gadd45g* en la respuesta proliferativa, se activaron células de nódulos linfáticos y células T CD4+ purificadas de nódulos linfáticos en presencia de concentraciones crecientes de distintos estímulos mitogénicos: anti-CD3 (α CD3, activación a través del TCR) solo o con IL2 y concanavalina A (ConA, que activa la célula por su capacidad de unión a azúcares de las glicoproteínas) y se determinó la curva de proliferación mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada. Los

resultados muestran, tanto en células aisladas de nódulos linfáticos como en células CD4+, que la ausencia de *Gadd45g* provoca un comportamiento hipoproliferativo de las células independientemente del estímulo utilizado. Esto indica que *Gadd45g* es un regulador positivo de proliferación de linfocitos T (Figura R11).

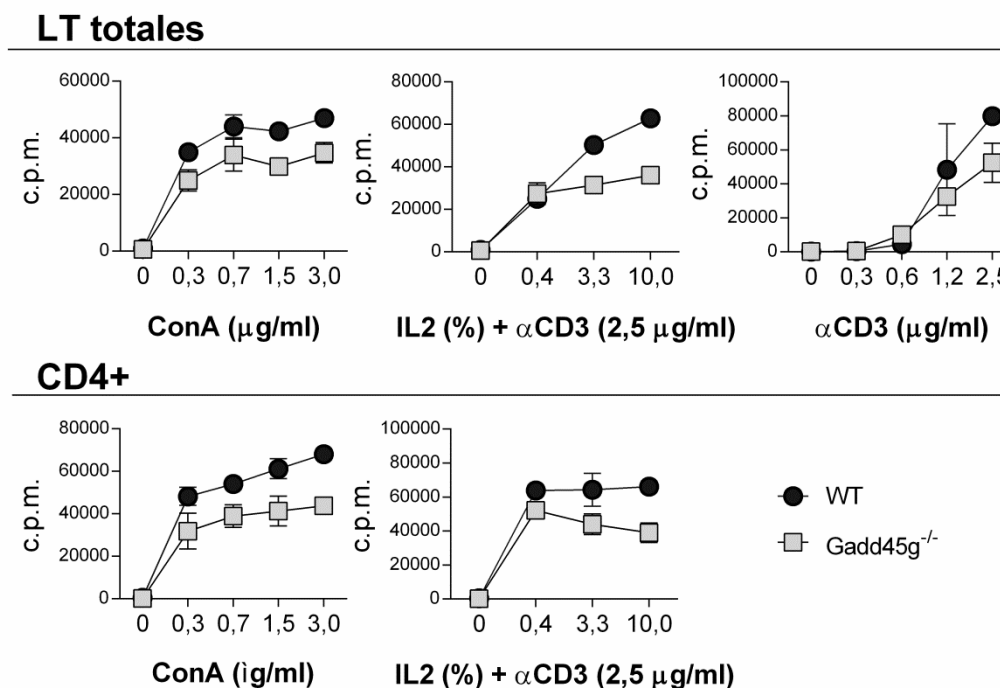


Figura R11. *Gadd45g* es un regulador positivo de proliferación. Células totales de nódulos linfáticos o células CD4+ aisladas fueron tratadas con cantidades crecientes de ConA, αCD3 o αCD3 más IL2 durante 48h, tras lo cual se añadió timidina tritiada al medio para medir la incorporación de la misma pasadas 18h. Se representan los valores de la media±sem de un experimento representativo de tres.

1.4.2. Estudio de la implicación de *Gadd45g* en la muerte inducida por activación (AICD) en células T CD4+

Uno de los procesos más importantes implicados en el mantenimiento de la tolerancia periférica es la AICD (Marsden et al. 2003). Para determinar si la falta de *Gadd45g* afecta a este proceso, células T CD4+ purificadas de nódulos linfáticos y bazo de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} se mantuvieron en medio completo sin estímulo o se trataron con ConA o αCD3 durante 24, 48, 72 o 96 h. Para simular de una forma más específica la AICD, las células se trataron con una combinación de estimulación primaria con αCD3 durante 2 días y, posteriormente, una activación secundaria a una dosis mayor

de α CD3 o ConA para inducir la muerte celular. La AICD es una muerte celular programada que sirve como mecanismo de mantenimiento de la tolerancia y la homeostasis del sistema inmunitario (revisado en (Green et al. 2003). Después de 24h, se recogieron las células y se analizó el porcentaje de células muertas por citometría de flujo con ioduro de propidio. No se observaron defectos en la AICD en las células deficientes en *Gadd45g* en comparación con las células wt (Figura R12).

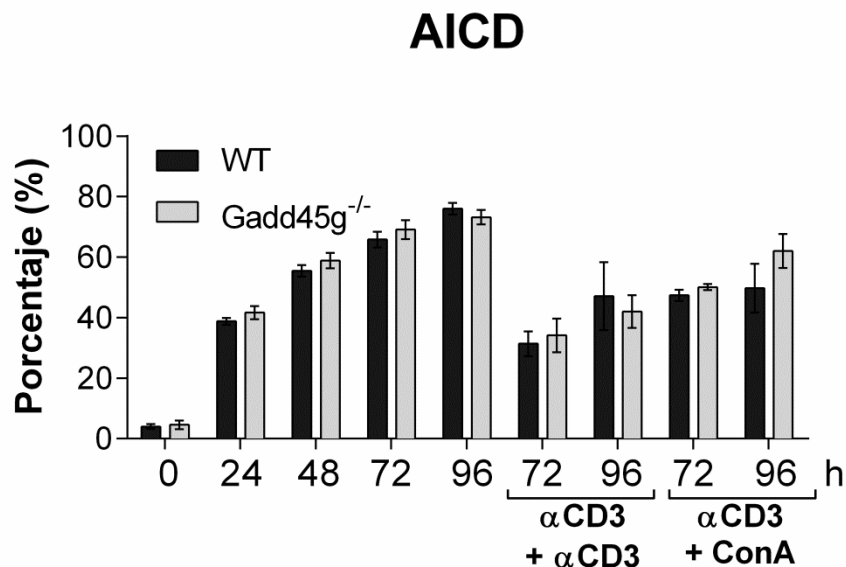


Figura R12. *Gadd45g* no es relevante en la AICD. Porcentaje de células T CD4⁺ muertas (en fase SubG1) de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} sin estímulo durante 24h y con dos diferentes tratamientos inductores de muerte por activación: estimulación primaria con α CD3 (5 μ g/ml) durante dos días y una secundaria también con α CD3 (10 μ g/ml) (α CD3/ α CD3) o con ConA (10 μ g/ml) (α CD3/ConA) durante otras 24h. Se representan los valores de la media \pm sem, $n \geq 4$; test estadístico, t de Student.

1.5. Estudio de la función de *Gadd45g* en células Th1, Th2 y Th17.

1.5.1. *Gadd45g* es necesario para la función de las células Th1.

Para el estudio de la función de *Gadd45g* en las células Th1 (T helper 1), se aislaron células CD4⁺ de nódulos linfáticos y bazo. Se diferenciaron a Th1 durante 5 días con IL-2, IL-12 y α IL-4. Se analizó la producción de IFN γ , IL-2 y TNF α tras estimulación de estas células Th1 de ratones wt y *Gadd45g*^{-/-} con α CD3 solo o con coestimulación con α CD28 (CoEst) durante 12 horas. No se observaron diferencias en la producción de IFN γ con

ninguno de los estímulos, sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL2 y de TNF α cuando se estimularon las células con α CD3 solo o en combinación con α CD28 en los ratones deficientes respecto a los wt (Figura R13).

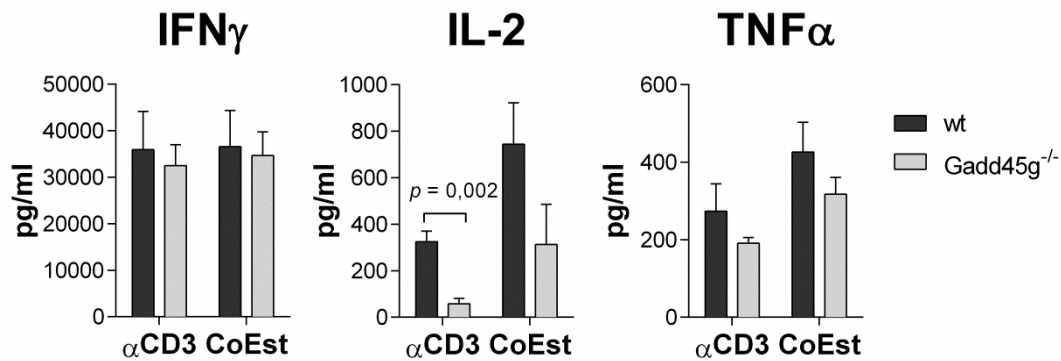


Figura R13. Producción de citoquinas (IFN γ , IL-2 y TNF α) en células Th1 tras activación con diferentes estímulos (α CD3, α CD3 + α CD28 (CoEst)). No se observaron diferencias en la producción de IFN γ . Se observa una menor producción de IL-2 y TNF α cuando se estimulan las células con α CD3 o α CD3 + α CD28 (CoEst). Se representa la media y el error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con la t de Student.

A la vista de estos resultados, se analizó la señalización intracelular de la cascada de MAPKs tras la estimulación de las mismas con α CD3 a diferentes tiempos. Se observó una menor activación de p38 y una mayor activación de JNK. No se observaron diferencias en la fosforilación de ERK (Figura R14).

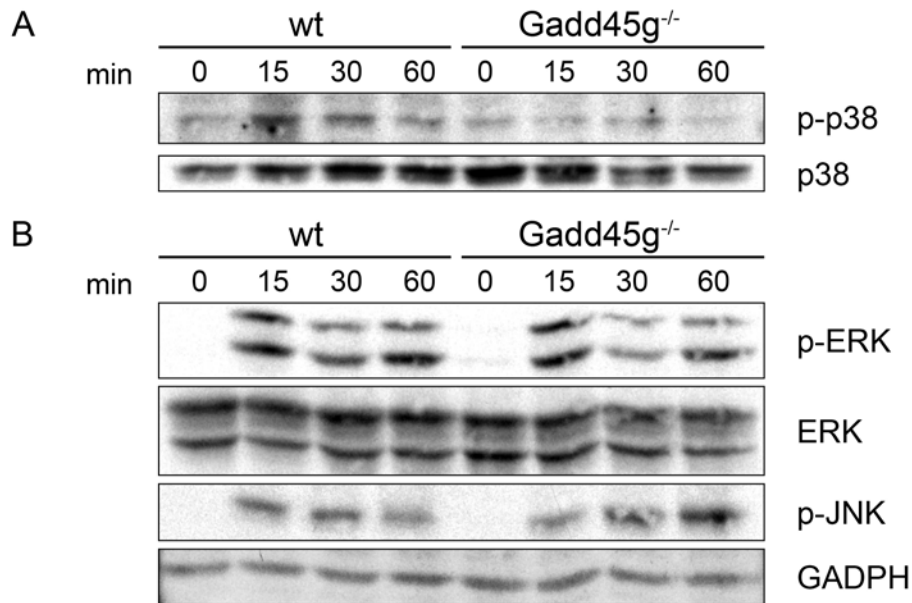


Figura R14. Western blot de células Th1 CD4⁺ wt y *Gadd45g*^{-/-} activadas a diferentes tiempos con α CD3. Se observa una menor activación de p38 y un retraso en la activación de JNK. Se utilizaron p38, ERK y GADPH como controles de carga. Experimento representativo de 2.

1.5.2. *Gadd45g* no es necesario para la función de las células Th2.

Se diferenciaron células T CD4⁺ de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt a células Th2 (T helper 2) de manera similar a como se ha comentado para las Th1. En este caso, se trataron las células durante 5 días con IL-4, IL-2 y α IL-12. Se estudió la producción de IL-4, IL-5 e IL-10, tras activación con α CD3 durante 12 horas, sin observar ninguna diferencia entre los ratones deficientes y los wt (Figura R15). También se analizó la activación de la cascada de señalización de MAPKs sin observar ninguna diferencia entre los ratones deficientes y los ratones wt (Figura R16).

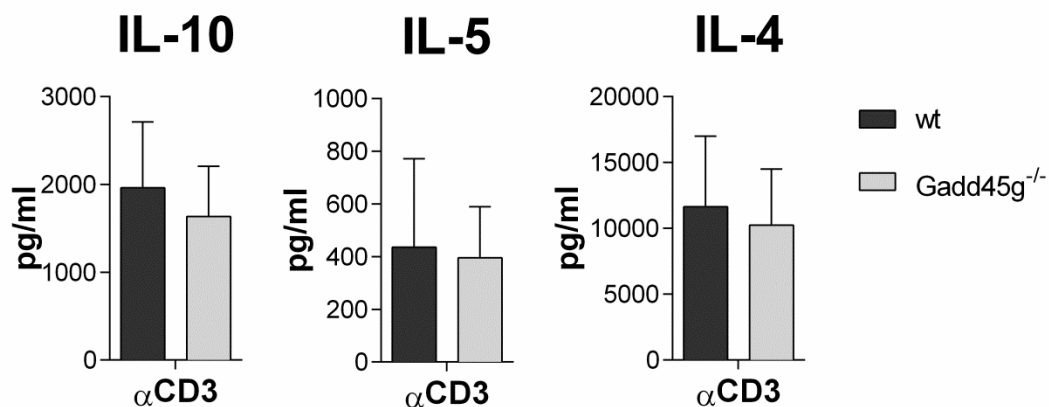


Figura 15. Producción de IL4, IL5 e IL10 por células T CD4+ diferenciadas a Th2 estimuladas con α CD3. No se observan diferencias en la producción de IL4. Se representa media \pm sem, análisis estadístico con t de Student (n=4).

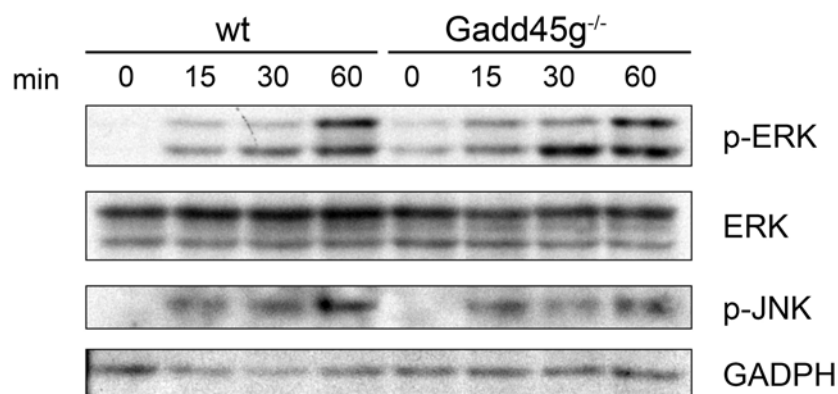


Figura R16. Western blot de células T CD4+ wt y *Gadd45g*^{-/-} diferenciadas a células Th2 y activadas a diferentes tiempos con α CD3. No se observan diferencias en la fosforilación de las distintas MAPKs analizadas. Se utilizaron ERK y GADPH como controles de carga. Experimento representativo de 2.

1.5.3. *Gadd45g* es necesario para la función de las células Th17.

Se diferenciaron células T CD4+ de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt a células Th17 de manera similar a como se ha comentado para las Th1 y Th2 pero tratando las células durante 5 días con TGF β 1, IL-6, IL-23, IL-2, α IL-4, α IL-12 y, α IFN γ . Se analizó la producción de IL-17 tras ser estimuladas con α CD3 solo o con coestimulación con α CD28 (CoEst) durante 12 horas. Se observó un aumento de la producción de IL-17 por parte de las células Th17 procedentes de ratones *Gadd45g*^{-/-} respecto de los ratones wt tanto en células activadas con α CD3 como con coestimulación (Figura R17).

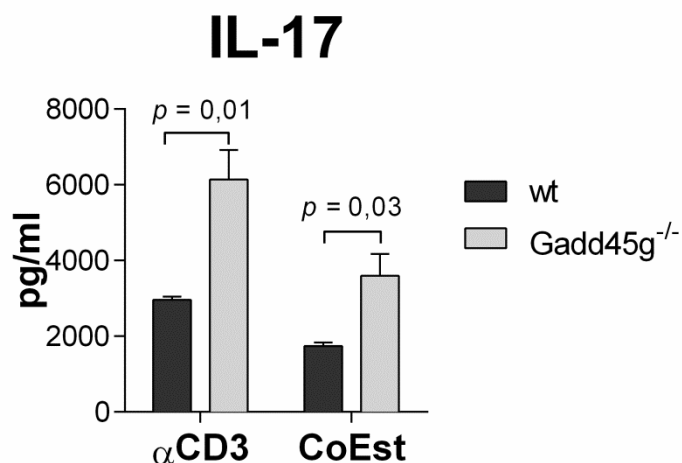


Figura R17. Producción de IL17 por células diferenciadas a Th17 con diferentes estímulos (αCD3, αCD3+ αCD28 (CoEst)). Se observa un aumento de la producción de IL17 en células *Gadd45g*^{-/-} en comparación con las células wt tras ser diferenciadas a Th17 y estimuladas con diferentes mitógenos. Se representa media±sem, análisis estadístico con t de Student (n=2).

1.6. *Gadd45g* en el desarrollo tímico de los LT.

Para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario es muy importante que la generación de los linfocitos T en el timo ocurra de manera adecuada. En este proceso tiene un papel importante la correcta activación de las MAPK. Así, se estudió la cascada de señalización de las MAPKs simulando los procesos de selección positiva y selección negativa que tienen lugar en el timo usando diferentes concentraciones de αCD3. Una activación fuerte (10 μg/ml) que simula las condiciones de la selección negativa, y una activación débil (0,5 μg/ml) que simula la selección positiva. Para esto, se obtuvieron timocitos de ratones *Gadd45g*^{-/-} y wt de un mes de edad, se activaron y se analizaron las MAPKs por western blot. En la activación débil, selección positiva, no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de p38, pero sí una menor fosforilación de JNK. En la activación fuerte, selección negativa, se observó un descenso acusado en el mantenimiento de la fosforilación de p38, bajando de los niveles basales a 60 minutos de activación. Adicionalmente, se observó una menor fosforilación de JNK y una mayor activación de ERK a tiempos cortos (15 minutos) (Figura R18).

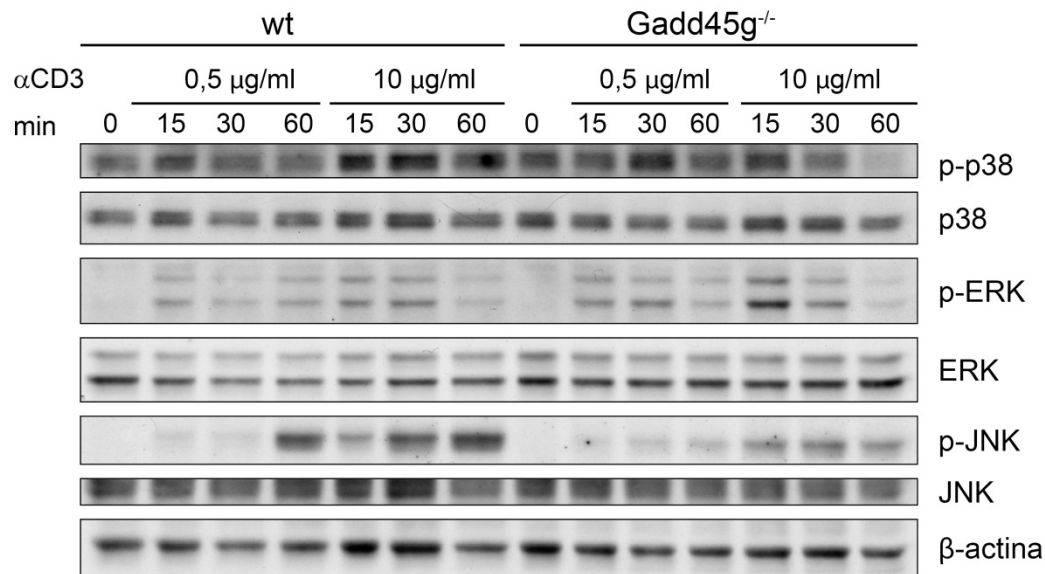
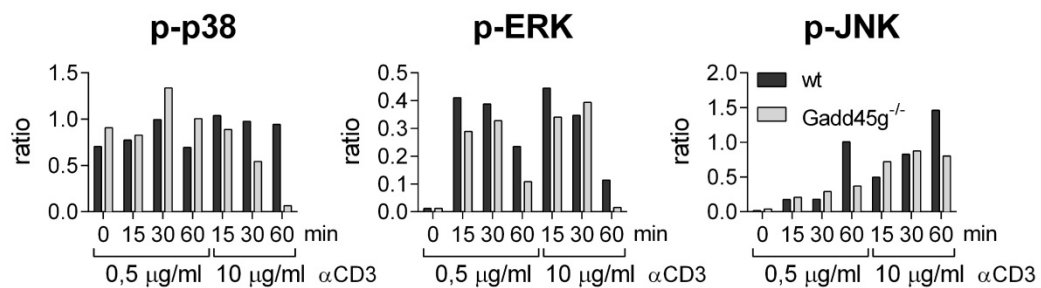
A**B**

Figura R18. Western blot y densitometría de células wt y *Gadd45g*^{-/-} procedentes de timo activadas con dos concentraciones de αCD3 y a distintos tiempos simulando la selección positiva y la negativa. A) Western blot de células wt y *Gadd45g*^{-/-}. En las células deficientes en *Gadd45g* se observan defectos en la fosforilación JNK tras la activación con 0,5 μg/ml (activación débil) y defectos en el mantenimiento de la fosforilación de p38, una activación más fuerte de ERK y una menor activación de JNK tras estimulación con 10 μg/ml (activación fuerte). B) Densitometrado del western blot de timocitos activados realizado con el programa Image J (Experimento representativo de 3).



2. *Gadd45g* en el desarrollo embrionario.

Es muy poco lo que se conoce sobre la implicación de la familia *Gadd45* en el desarrollo embrionario. En la bibliografía, existen datos sobre algunas funciones modestas de estas proteínas en el desarrollo del cerebro y en la somitogénesis; sin embargo, no se describe ningún fenotipo llamativo en el desarrollo embrionario de los ratones deficientes en estas proteínas. En este trabajo hemos abordado si la ausencia de *Gadd45g* en ratones puede afectar al correcto desarrollo embrionario.

2.1. Reversión del sexo de ratones *Gadd45g*^{-/-} XY.

Durante la gestión de la colonia de ratones se observaron anomalías importantes en la proporción de ratones machos y hembras, así como en su capacidad de reproducción. El análisis del fenotipo sexual permitió observar la ausencia de ratones machos deficientes en *Gadd45g* en el fondo C57BL/6 y la presencia de genitales ambiguos (vagina imperforada, micropene y distancia anogenital anormal) en el fondo genético mixto 129J-C57BL/6. Esta observación nos llevó a iniciar un estudio descriptivo exhaustivo de los órganos sexuales de los ratones deficientes en *Gadd45g*.

En una primera aproximación, se analizó en todos los ratones (indistintamente de su apariencia fenotípica) la presencia del cromosoma Y mediante la detección por PCR del gen *Sry*. Sorprendentemente, se encontró que un gran número del primer grupo de ratones analizados expresaba el gen *Sry* a pesar de tener un fenotipo femenino (Figura R19). En una segunda aproximación, se decidió analizar la integridad de los cromosomas sexuales en los ratones mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, Figura R20). Esta técnica permitió confirmar que los cromosomas Y presentes estaban completos, descartándose la posibilidad de que se hubiera producido una traslocación de la región del cromosoma Y, que contiene el gen *Sry*, a otro cromosoma.

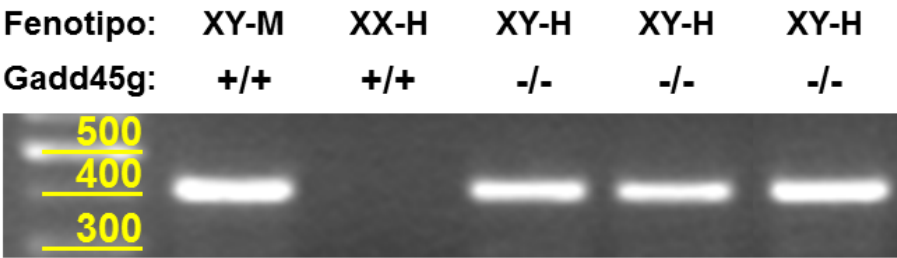


Figura R19. Presencia del gen *Sry* en ratones *Gadd45*^{+/+} y *Gadd45*^{-/-} con fenotipo femenino. Se observa la presencia del gen *Sry* en ratones *Gadd45g*^{+/+} machos, su ausencia en *Gadd45g*^{+/+} hembras (XX-H) y su presencia en *Gadd45g*^{-/-} fenotípicamente hembras (XY-H). La imagen corresponde a un gel de agarosa al 1% con el producto de PCR para el gen *Sry* obtenido a partir de DNA genómico aislado de la cola. Los números que aparecen en el primer carril de la izquierda corresponden al tamaño en número de bases de las bandas de peso molecular del ADN. Genotipo sexual: XY, XX. Fenotipo sexual: M (macho), H (hembra).

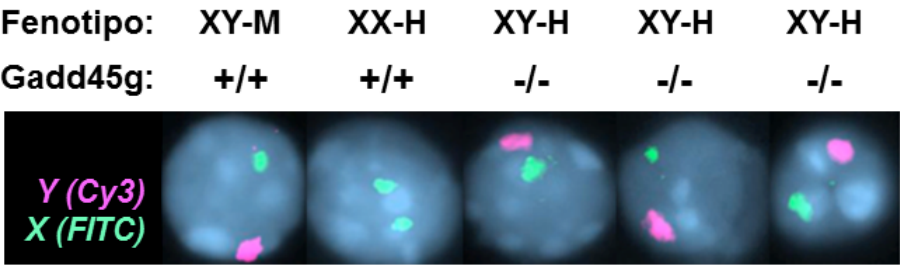


Figura R20. FISH de ratones *Gadd45*^{+/+}, machos y hembras, y *Gadd45*^{-/-} con fenotipo femenino. Se observa la presencia del cromosoma Y (en rosa) completo en ratones *Gadd45g*^{-/-} fenotípicamente hembras así como la presencia de un solo cromosoma X (en verde).

En este punto nos planteamos que la ausencia de *Gadd45g* estaba produciendo un fenómeno de reversión sexual. De hecho, la clasificación sexual en mamíferos se puede establecer en base a tres criterios: a) el genético determinado por la dotación cromosómica, b) el gonadal, debido al desarrollo de testículos u ovarios en machos o hembras y c) el fenotípico, debido a la producción de hormonas que conduce a un desarrollo fenotípico masculino o femenino. La discrepancia entre el sexo genético con respecto al gonadal o fenotípico se conoce como reversión sexual.

Por ello, el siguiente paso de nuestro estudio consistió en obtener datos cuantitativos de la frecuencia de los distintitos tipos de ratones (machos XY-M, hembras XX-F y ratones con apariencia de hembras y cromosomas masculinos XY-H) encontrados tanto en la colonia de ratones con fondo genético puro C57BL/6 como en la colonia de fondo mixto 129J-C57BL/6; incluyendo en la observación al menos a 300 ratones de cada fondo. Como se puede observar en la figura R21B, la ausencia de *Gadd45g* origina que en el fondo genético 129J-C57BL/6 el 80% de los ratones XY

nazcan con reversión del sexo de macho a hembra. Así mismo, en el fondo genético C57BL/6, el 100% los ratones *Gadd45g*^{-/-} XY y el 3% de los *Gadd45g*^{+/-} nacen con reversión del sexo de macho a hembra, es decir son hembras-XY (XY-H) (Figura R21A).

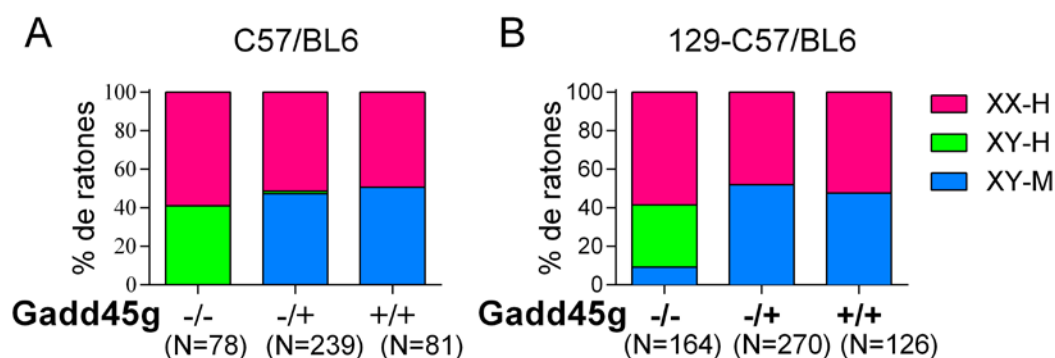


Figura R21. Frecuencia de la reversión del sexo en ratones con distintos genotipos de *Gadd45g* en los fondos genéticos 129J-C57BL/6 y C57BL/6. Representación en porcentaje de la frecuencia de los diferentes tipos de ratones atendiendo a su apariencia externa y dotación cromosómica. A) En el fondo puro C57BL/6 y B) En el fondo mixto 129J-C57BL/6 (N, número de ratones).

Profundizando en nuestro estudio decidimos hacer un análisis exhaustivo de la correlación entre los órganos sexuales externos e internos, así como de su funcionalidad analizada por histología. En la figura R22A y B, se muestran los órganos reproductores externos de ratones control macho y hembra. Se observa que la distancia anogenital es mayor en el macho control que en la hembra control. En el fondo genético C57BL/6, los órganos reproductivos externos de los ratones *Gadd45g*^{-/-} XY (Figura R22C) son indistinguibles de los de las hembras *Gadd45g*^{+/-} (Figura R22B). La apariencia de los órganos reproductores internos de los *Gadd45g*^{-/-} XY (Figura R22H) son similares a los de las hembras *Gadd45g*^{+/-} (Figura R22I), con un ovario, oviducto y útero perfectamente formados y de tamaño similar. El análisis histológico de las gónadas no reveló anomalías evidentes. Todos los cortes histológicos de ovarios de ratones *Gadd45g*^{-/-} hembras-XY teñidos con hematoxilina/eosina presentan oocitos y folículos en diferentes estadios de desarrollo (Figura R22O, U). La presencia de cuerpos

lúteos (Figura R22U) en todos los ovarios de ratones *Gadd45g*^{-/-} XY indica que ha tenido lugar ovulación en los mismos.

Sin embargo, en el fondo mixto 129J-C57BL/6 los órganos reproductores externos e internos de los ratones *Gadd45g*^{-/-} XY muestran una amplia variedad de desórdenes de desarrollo sexual (DSD) que podemos clasificar en tres grupos. En el primero, los ratones muestran fenotipo y aparato reproductor masculino (XY-M), aunque los testículos son hipoplásicos (Figura R22D, J) y los ratones son infértiles. El análisis histológico muestra túbulos seminíferos hipoplásicos con espermatogénesis reducida e hiperplasia de células intersticiales (frecuente en infertilidad, Figura R22P). No se encontraron espermatozoides ni en el epidídimo ni en los vasos deferentes (Figura R22V). Los ratones del segundo grupo (XY-H, Figura R22E, K) tienen fenotipo y aparato reproductor femeninos. Estos ratones tienen órganos reproductores femeninos dotados de ovarios, oviductos y cuernos uterinos; aunque los ovarios contienen básicamente células intersticiales y folículos primarios, pero no otros estadios del desarrollo folicular (Figura R22Q, W). Todas las hembras-XY en las que se comprobó su fertilidad resultaron ser estériles. El tercer grupo (XY-intersexo, Figura R22F, L) consistía en ratones intersexo con órganos genitales externos bien masculinos, femeninos o ambiguos y órganos reproductores internos con características masculinas y femeninas simultáneamente. Por ejemplo, un lado del aparato reproductor desarrolló un testículo hipoplásico con epidídimo y vaso deferente (Figura R22L) y en el lado contrario desarrolló un ovario con oviducto y útero o un ovotestis con tejido ovárico y testicular en la misma gónada (Figura R22L, R, X).

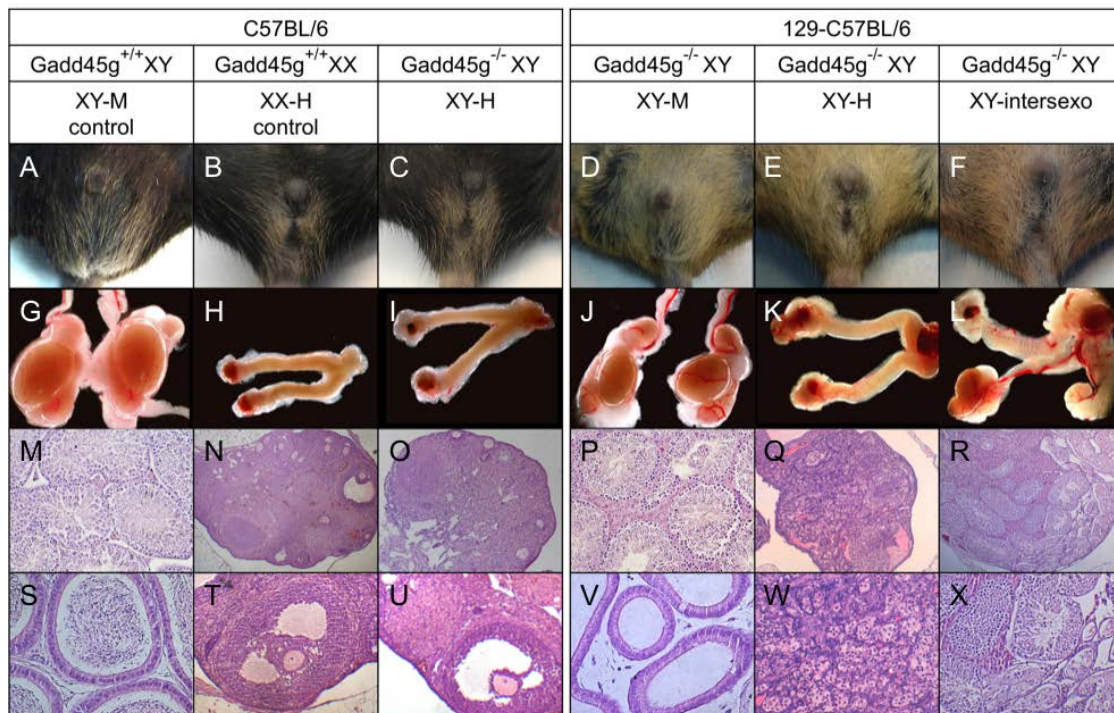


Figura R22. Reversión del sexo XY completa o parcial de ratones *Gadd45g*^{-/-} en el fondo puro C57BL/6 o mixto 129J-C57BL/6. A-F. Genitales externos, G-L. Órganos reproductores internos (magnificación 8x) y M-X. Tinciones con hematoxilina/eosina de cortes de gónadas o epidídimos de ratones *Gadd45g*^{-/-} o *Gadd45g*^{+/+} adultos. Los órganos reproductores externos e internos (C, I) de ratones *Gadd45g*^{-/-} XY en el fondo puro (XY-H) son morfológicamente indistinguibles de las hembras control (B, H). Los ovarios de las hembras-XY teñidos con hematoxilina/eosina parecen normales contienen oocitos y folículos en diferentes estados de maduración (O), incluyendo folículos antrales con oocitos (U). Se encontraron cuerpos lúteos en los ovarios de hembras-XY y hembras-XX (N, O, T, U). En los ratones *Gadd45g*^{-/-} XY en el fondo mixto 129J-C57BL/6 se observó un gran rango de desórdenes del desarrollo sexual (DSD) que pueden dividirse en tres grupos: 1. Machos-XY infértiles (D) con fenotipo y órganos reproductores internos y externos masculinos (J; testículos, epidídimos, vasos deferentes y vesícula seminal [no mostrada]) con testículos hipoplásicos (comparar J con G). Los túbulos seminíferos mostraban una espermatogénesis reducida e hiperplasia de células intersticiales (P), y no se observaron espermatozoides ni en el epidídimo (V) ni en el los vasos deferentes. 2. Hembras-XY infértiles (E) con órganos reproductores internos femeninos (ovarios, oviductos, útero) (K), aunque, los ovarios solo contenían folículos primordiales y células intersticiales (Q, W). 3. Ratones intersexo-XY (F) con características femeninas y masculinas simultáneamente. Los órganos externos eran masculinos, femeninos o ambiguos (F); por ejemplo, un testículo hipoplásico con epidídimo y vasos deferentes (L) y en el lado contrario desarrollaban un ovario hipoplásico con oviducto y útero (L, R, X). Magnificación: 5x (N,O,Q,R) o 10x (M,P,S,T,U,V,W,X).

2.2. Análisis de la distribución de los sexos en las colonias deficientes en *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Gadd45g* y dobles deficientes.

Dada la importancia de *Gadd45g* en determinación del sexo, se decidió analizar si también los otros dos miembros de la familia (*Gadd45a* y *Gadd45b*) compartían esta función. Para ello, se cruzaron ratones *Gadd45a*^{+/-}, *Gadd45b*^{+/-} y *Gadd45g*^{+/-}, entre ellos, y se estudió su descendencia durante varias generaciones en un fondo mixto 129J-C57BL/6. Se analizó la presencia del gen Sry por PCR en todos los ratones con fenotipo femenino, estableciendo dos grupos: uno de hembras que lo eran fenotípica y genotípicamente (es decir XX-H) y otro de ratones que presentaban fenotipo femenino y genotipo masculino (es decir XY-H). Se observó que la descendencia de los ratones deficientes únicamente en *Gadd45a* o *Gadd45b* es la esperada y, por tanto, no hay reversión del sexo ya que todos los ratones hembras fenotípicamente lo eran también genotípicamente. Del mismo modo, la haploinsuficiencia de *Gadd45g* (+/-) en combinación con la deficiencia de *Gadd45a* o *Gadd45b* origina una descendencia normal. Sin embargo, la descendencia en la que *Gadd45g* está ausente (-/-) presenta reversión del sexo superior al 30% de las hembras que genotípicamente son machos (XY-H), independientemente de la presencia de *Gadd45a* o *Gadd45b* en deficiencia total o parcial (Tabla R1). Estos resultados nos indican que solo *Gadd45g* es relevante en la determinación del sexo y que, a pesar de la similitud con los otros dos miembros de la familia Gadd45, no hay redundancia de estas proteínas en esta función.

| | | Gadd45g^{-/-} | | | | Gadd45g^{+/-} | | | | Gadd45g^{+/+} | | | |
|----------------------------|----------------|------------------------------|------|------------|------|------------------------------|------|------------|------|------------------------------|------|------------|------|
| | | número | | porcentaje | | número | | porcentaje | | número | | porcentaje | |
| Gadd45a | Gadd45b | XX | XY-H | XX | XY-H | XX | XY-H | XX | XY-H | XX | XY-H | XX | XY-H |
| +/+ | +/+ | 45 | 24 | 65 | 35 | 79 | 0 | 100 | 0 | 173 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | +/+ | 12 | 7 | 63 | 37 | 13 | 0 | 100 | 0 | 81 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | +/+ | 2 | 1 | 67 | 33 | 4 | 0 | 100 | 0 | 23 | 0 | 100 | 0 |
| +/+ | +/- | 5 | 2 | 71 | 29 | 19 | 0 | 100 | 0 | 19 | 0 | 100 | 0 |
| +/+ | -/- | 5 | 5 | 50 | 50 | 6 | 0 | 100 | 0 | 16 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | +/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 38 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | -/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 37 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | -/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 42 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | +/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 30 | 0 | 100 | 0 |
| Todos los genotipos | | 69 | 39 | 64 | 36 | 121 | 0 | 100 | 0 | 459 | 0 | 100 | 0 |

Tabla R1. *Gadd45a* y *Gadd45b* no desempeñan ningún papel en la determinación del sexo

2.3. Análisis de la expresión de *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Gadd45g* en gónadas embrionarias.

Nos planteamos confirmar estos datos de forma alternativa, analizando si existía una expresión diferencial de las proteínas Gadd45 en gónadas embrionarias durante el periodo de determinación del sexo. Para ello, se generaron sondas específicas de ADN para la longitud completa del ARN de cada una de las isoformas de Gadd45. Se extrajo el ARN de embriones y se obtuvo el ADNc usando primers específicos. A partir de este ADNc se obtuvieron sondas de ADN marcadas con DIG con la que se realizaron hibridaciones *in situ* de gónadas completas control *Gadd45g^{+/+}* obtenidas de embriones a los días críticos de determinación del sexo (11.5-12.5 dpc). Detectamos una expresión clara de *Gadd45g* en gónadas, expresión que además es tejido-específica, ya que no se detectó en el mesonefros. Sin embargo, la expresión de *Gadd45a* y *Gadd45b* no se detectó en la gónada ni tampoco en el mesonefros (Figura R23).

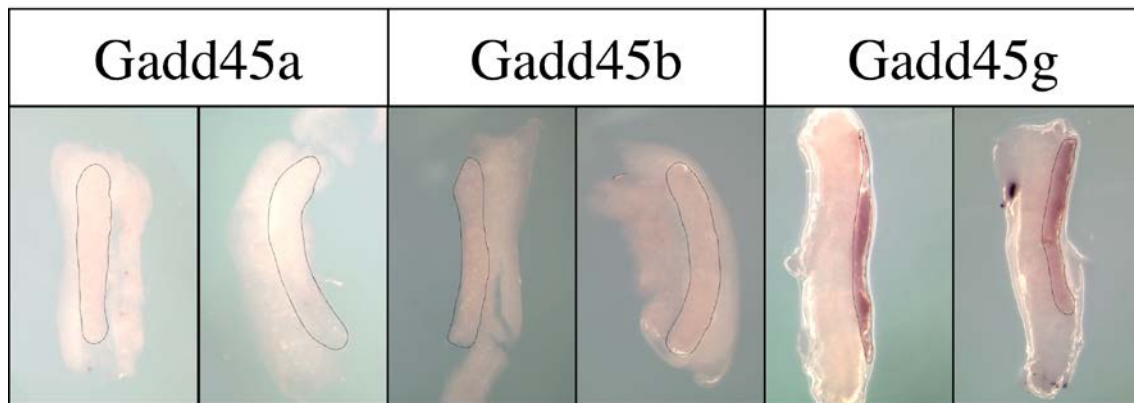


Figura R23. *Gadd45g* se expresa en las gónadas durante el período crítico de la determinación sexual. Hibridación in situ con sondas específicas para *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Gadd45g* de gónadas completas entre 11,5 y 12,5 dpc.

Nuestros resultados correlacionan bien con los datos de microarrays publicados en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). En esta web, aparecen análisis de células precursoras de células somáticas de soporte (que, posteriormente, darán lugar a células de Sertoli y de la granulosa) en las que no se observa expresión ni de *Gadd45a* ni de *Gadd45b*. Sin embargo, la expresión de *Gadd45g* claramente aumenta entre 10.5 y 11.5 dpc (Figura R24).

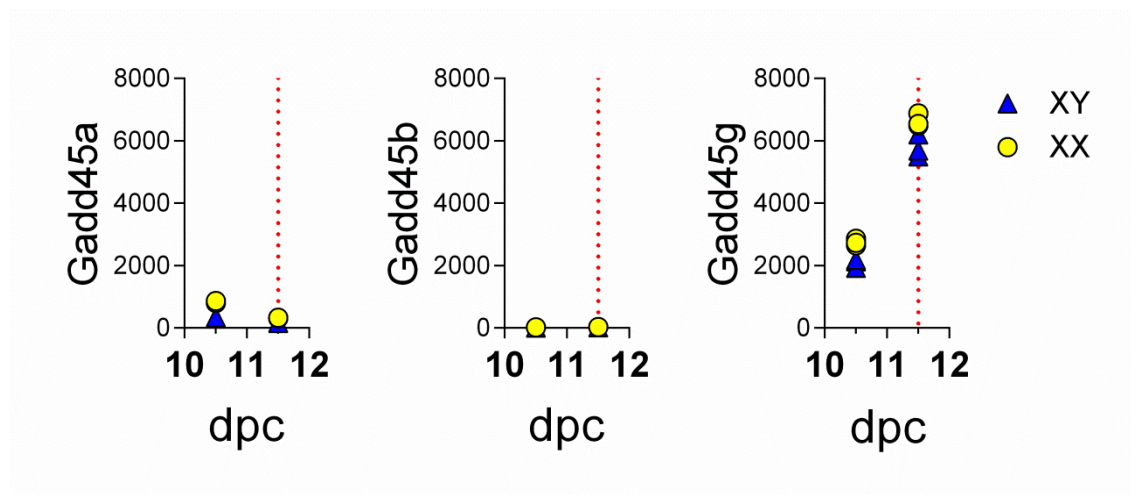


Figura R24. Cuantificación relativa de la expresión de los miembros de la familia *Gadd45* en células somáticas precursoras purificadas. Representación de los niveles de expresión relativos de *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Gadd45g* durante el periodo crítico de la determinación del sexo (11.5-12.5dpc). Datos obtenidos de la base de datos GEO (set de datos GDS1724).

2.4. Análisis de la expresión de *Gadd45g* en las gónadas embrionarias.

Nos planteamos como hipótesis una posible expresión diferencial de *Gadd45g* en gónadas masculinas y femeninas durante el período de determinación del sexo. Para responder a esta pregunta realizamos retrotranscripción-PCR cuantitativa (qRT-PCR) con el ARNm obtenido de gónadas embrionarias. El resultado obtenido (Figura R25) indicó que el patrón de expresión de *Gadd45g* no es dimórfico (es decir, no es diferente en los dos tipos de gónadas) y, además, alcanza niveles máximos de expresión, tanto en gónadas XX como en gónadas XY, en el momento en el que tiene lugar la determinación primaria del sexo (11.5 dpc = 18 somitos de la cola).

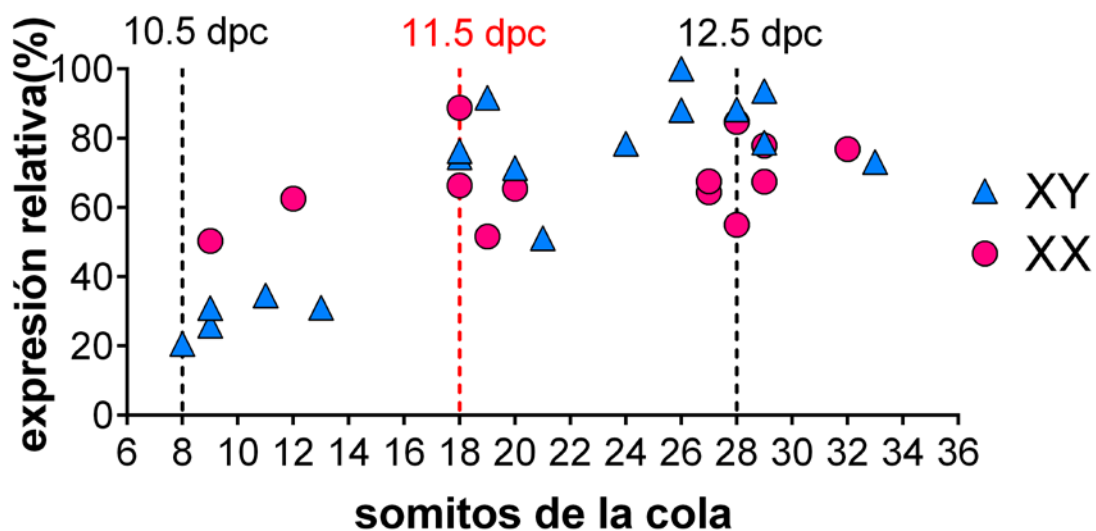


Figura R25. Expresión similar de *Gadd45g* en las gónadas de embriones XX y XY. Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Gadd45g* en gónadas unidas al mesonefro de embriones control a distintos tiempos de desarrollo, entre los 8 y los 33 somitos de la cola. La expresión de *Gadd45g* es similar en gónadas de embriones XX y XY, alcanzando su máxima expresión a los 18 somitos de cola =entre 11.5 y 12.5 dpc.

2.5. Análisis de marcadores tempranos de diferenciación testicular en ratones *Gadd45g*^{+/+} y *Gadd45g*^{-/-} de fondo genético C57BL/6.

Nos planteamos investigar si la ausencia de *Gadd45g* afectaba a mecanismos moleculares clave de señalización, durante la ventana de diferenciación sexual. Mediante microscopia confocal se realizaron cortes ópticos de gónadas completas de embriones de ratón de entre 12.5 y 13.5 dpc. Los resultados obtenidos (Figura R26) indicaron que en las gónadas XY, la línea celular somática de soporte (pre-Sertoli) expresa SRY que induce la expresión de SOX9 (Figura R26A, D, G, J) que da lugar a la diferenciación de células de Sertoli y a la diferenciación testicular. Además, a 13.5 dpc las células de Sertoli diferenciadas producen la hormona anti-Mülleriana (AMH) (Figura R26G, J) que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller en el embrión masculino. Como consecuencia, la producción de testosterona por los testículos dirigirá el desarrollo de los conductos de Wolff hacia la formación de los epidídimos, vasos deferentes y vesículas seminales. Sin embargo, en las gónadas XX la ausencia de la expresión de SRY, provoca una bajada en la expresión de SOX9 (Fig. R26B, E, H, K) y activa el programa de genes específico de las hembras, dando lugar a la diferenciación de la línea celular de soporte hacia células de granulosa, necesarias para el desarrollo de los oocitos. En el caso de las gónadas *Gadd45g*^{-/-}, a 11.5 dpc se observó una ausencia casi completa de células que expresaran SOX9 (Figura R26C, F) comparado con su presencia en las gónadas control. Además, no se observó formación de cordones testiculares, ni la expresión de AMH (Figura R26I, L) o de SOX9 posterior a 12.5 dpc.

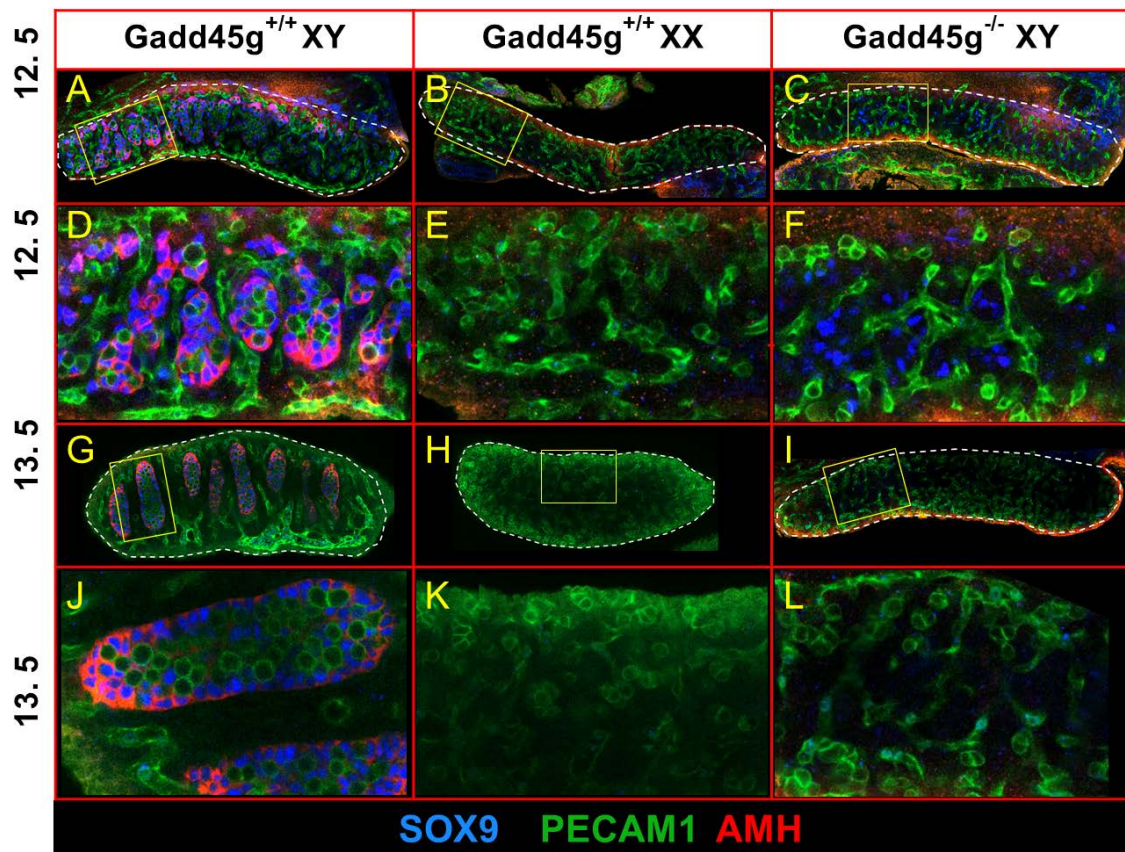


Figura R26. Bloqueo en la diferenciación de células de Sertoli y en la formación de cordones testiculares en gónadas *Gadd45g*^{-/-} XY. A-L) Microscopia confocal de gónadas C57BL/6 teñidas para los marcadores SOX9 (núcleo, azul) y AMH (citoplasma, rojo) de células de Sertoli, y un marcador de células endoteliales y germinales, PECAM1 (membrana, verde). A) Desde 12.5 dpc, las gónadas masculinas pueden distinguirse morfológicamente de las femeninas. B) Ausencia de cordones testiculares que contienen células de Sertoli que expresan SOX9. C) En las gónadas *Gadd45g*^{-/-} XY se expresa de forma transitoria SOX9 en un pequeño número de células a 12.5 dpc. D-F) y J-L) son detalles de las imágenes superiores. G) A 13.5 dpc, en las gónadas masculinas, todas las células germinales se encuentran dentro de los cordones testiculares rodeadas por una capa de células de Sertoli que expresan SOX9 y AMH. H-I-K-L). No se observa formación de cordones testiculares ni expresión de AMH en gónadas *Gadd45g*^{+/+} XX (H, K) ni en *Gadd45g*^{-/-} XY (I, L).

2.6. *Gadd45g* es necesario para la expresión de SRY y el desarrollo de testículos.

A continuación, analizamos si la ausencia de *Gadd45g* podía afectar la regulación de la expresión de *Sry*. Para ello comparamos su expresión por qRT-PCR en gónadas *Gadd45g*^{-/-} XY y gónadas XY control (Figura R27A). Nuestros resultados indicaron una

fuerte inhibición de la expresión de *Sry* en las gónadas de 18 somitos de la cola de embriones *Gadd45g*^{-/-} (hasta niveles cercanos al límite inferior de detección). En los ratones *Gadd45g*^{+/-} se detectó un retraso en la expresión de *Sry* que alcanzó, sin embargo, niveles similares al de las gónadas control entre los 19 y 20 somitos de la cola (Figura R27B). Estos resultados indican que *Gadd45g* es imprescindible para una correcta expresión del gen *Sry*, que es el responsable del inicio de las señales que llevarán a la formación de testículos y, como consecuencia, de la generación de individuos con características masculinas.

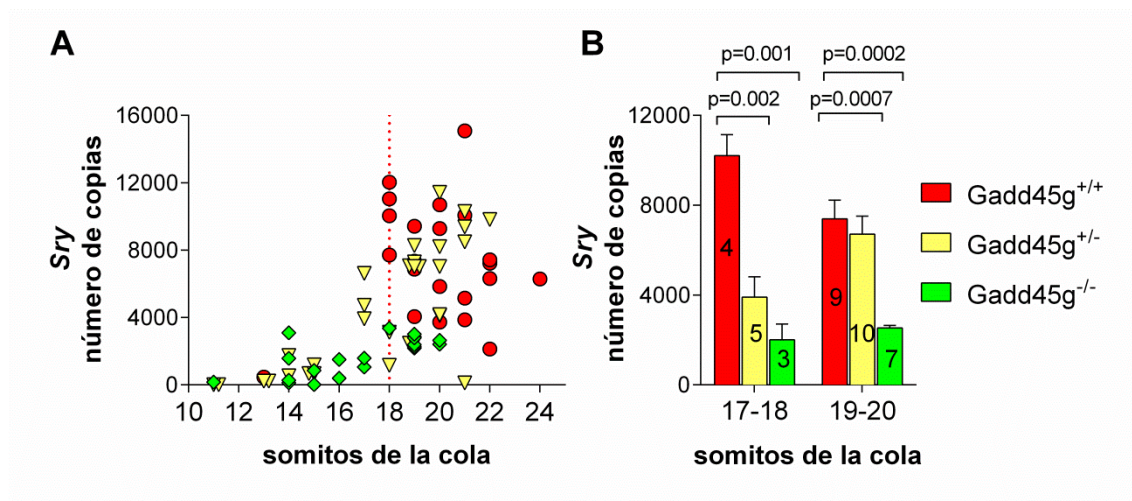


Figura R27. Inhibición de la expresión de *Sry* en las gónadas *Gadd45g*^{-/-}-XY. Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Sry* en gónadas XY *Gadd45g*^{+/+}, *Gadd45g*^{+/-} y *Gadd45g*^{-/-} entre 11 y 24 somitos de la cola. A) Representación del número de copias del gen *Sry*. B) Análisis comparativo de los niveles de expresión de *Sry* en los periodos entre 17-18 y 19-20 somitos de la cola en ratones *Gadd45g*^{+/+}, *Gadd45g*^{+/-} y *Gadd45g*^{-/-}. Los números en las barras en B indican el número de muestras.



Discusión



Discusión

1. *Gadd45g* en el sistema inmunitario.

La relevancia de la familia Gadd45 en el sistema inmunitario ha sido ampliamente estudiada, sobre todo en lo referente a *Gadd45a* y *Gadd45b*. Ambos miembros han sido caracterizados como claves en la inmunidad innata teniendo en cuenta su implicación en la diferenciación, proliferación y función de células mieloides. La diferenciación in vitro de células de médula ósea deficientes en *Gadd45a* o *Gadd45b* a macrófagos y granulocitos resulta en un número menor de estas células en comparación con células control (Gupta et al. 2006). Además, en un estudio en el que se inyectó LPS intraperitonealmente a ratones deficientes en *Gadd45b* resultó un menor reclutamiento de macrófagos, asociándose a una menor activación de la MAPKs p38 y JNK (Salerno et al. 2012). En lo referente a la inmunidad adaptativa, la mayor parte de los estudios han sido realizados en células T, aunque cabe destacar que *Gadd45b* se expresa en células B tras estimulación a través de la molécula coestimuladora CD40 (Zazzeroni et al. 2003). *Gadd45b* también se expresa en células NKT, aunque su función no está bien caracterizada (Harada et al. 2004). Las células dendríticas derivadas de médula ósea expresan los tres miembros de la familia Gadd45 y, de hecho, las células dendríticas deficientes en *Gadd45a* producen menos citoquinas de tipo Th1 relacionado con una menor activación de p38 en éstas células (Jirmanova et al. 2007). Las células dendríticas deficientes en *Gadd45b* responden produciendo menos IFN γ en respuesta a LPS (Lu et al. 2004). Se ha visto que *Gadd45b* y *Gadd45g* son relevantes en la función de células Th1 puesto que la ausencia de cualquiera de ellos desemboca en un menor producción de citoquinas y una peor respuesta en ensayos de hipersensibilidad por contacto (Hoffmeyer et al. 2001, Lu et al. 2001, Ju et al. 2009). Muchos de estos efectos son debidos al efecto de los miembros de la familia Gadd45 sobre la ruta de señalización de p38 principalmente. Sin embargo, mientras que *Gadd45b* y *Gadd45g* actuarían positivamente sobre la activación de p38 en células T activando la MEKK4 (MAP3K4), *Gadd45a* actúa bloqueando la fosforilación de la misma en la Tyr323 por ZAP70 en una activación alternativa a través del TCR (Salvador et al. 2005, Salvador et al. 2005). Todos estos datos nos dan una idea del importante papel de la familia Gadd45 en el sistema

inmunitario. Además, *Gadd45g* se induce por una de las citoquinas principales en la respuesta inmune, la IL-2 (Beadling et al. 1993). Se ha descrito la disrupción de la expresión de *Gadd45g*, por metilación de su promotor, en varios tipos de tumores como tumor de tiroides anaplásico (Chung et al. 2003), adenoma de pituitaria (Zhang et al. 2002) o cáncer de próstata (Flores et al. 2010), entre muchos otros (Ying et al. 2005) (Zhang et al. 2010); y *Gadd45g* ha sido descrito como un gen importante en la respuesta adaptativa a tumores (Ju et al. 2009). Por todo ello, se decidió realizar un estudio en profundidad de la función de *Gadd45g* en el sistema inmunitario.

Nosotros llevamos a cabo un análisis detallado de las diferentes poblaciones celulares, a diferentes edades y en los dos sexos, de nódulos linfáticos, bazo y timo. Primeramente, destacar que se observó un aumento en la celularidad del timo de los ratones de 4-8 semanas deficientes de *Gadd45g* en comparación con los ratones wt. La señalización de la cascada de las MAPKs es clave en los procesos de selección positiva y negativa que tienen lugar en el timo. En concreto, en selección negativa, p38 y JNK son las principales quinasas implicadas (Rincon et al. 1998, Sugawara et al. 1998). Se ha visto en ensayos con inhibidores específicos de p38 y en ratones deficientes en JNK1 y JNK2, que un fallo en la señalización en estas proteínas provoca un fallo en selección negativa y por tanto la aparición de linfocitos T autorreactivos que pueden llevar a la aparición de enfermedades de tipo autoinmune. En nuestros ratones, la ausencia de *Gadd45g* parece provocar un defecto en la selección negativa, como se desprende de la menor activación de p38 y JNK en los ensayos in vitro de activación de timocitos y que provocaría que células que deberían ser eliminadas sean mantenidas dando como resultado un aumento de número de células presentes en el timo. Este aumento de celularidad del timo desaparece en los ratones de 6-12 meses siendo, en éstos, similar a la de los ratones wt. En los ratones de 6-12 semanas no se observa un aumento de celularidad pero sí una alteración en los porcentajes de las poblaciones CD4 simples positivas y de las DP; habría un desequilibrio hacia las CD4 SP consecuencia del fallo en la selección positiva y negativa observada que se produce en las DP y que produciría una disminución de éstas. Esto podría llevar a la generación de un repertorio anormal de linfocitos T que en determinadas condiciones microbiológicas y, según el elenco de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, podrían desarrollar

enfermedades autoinmunes y alteraciones en la respuesta a infecciones. Sería interesante investigar más a fondo este efecto, que espontáneamente se revierte en los adultos, y que no parece causar ninguna enfermedad en condiciones normales. De modo que parece que en timocitos deficientes en *Gadd45g* existe un fallo en la activación de las MAPKs ya desde su generación lo que podría explicar la menor producción de citoquinas por estas células en la periferia en comparación con las wt aunque muchos serían autorreactivos y reconocerían antígenos propios no serían capaces de realizar una respuesta efectiva a ellos.

La apoptosis inducida por activación de células T (AICD) es un proceso clave en la resolución de una respuesta inmune. En los estudios realizados en ratones se ha implicado a *Gadd45b* en el proceso de apoptosis bien como inhibidor de la misma bloqueando MKK7 (Papa et al. 2008) (Tornatore et al. 2008) o bien como inductor activando MEKK4 (MAP3K4) (Takekawa et al. 1998). Estudios en nuestro laboratorio apoyan la función de *Gadd45b* como inductor de apoptosis en ensayos de AICD en células T activando la MEKK4 y su cascada de señalización. En nuestro estudio, la ausencia de *Gadd45g* no afecta a la AICD de células T, en línea con lo observado en estudios realizados en ratones deficientes en *Gadd45a* (Salvador et al. 2005).

Las células deficientes en *Gadd45g* muestran un comportamiento hipoproliferativo que podría deberse a la que la ausencia de *GADD45g* impediría la activación de MAP3k4 y de sus sustratos p38 y JNK (Takekawa et al. 1998), lo que coincidiría con lo encontrado también en el timo. En este punto, *Gadd45g* se diferencia de manera importante de los otros miembros de la familia, puesto que tanto la ausencia de *Gadd45a* como de *Gadd45b* provocan un aumento de la proliferación de las células. Esta diferencia puede ser debida a una preferencia por estas dos proteínas por la interacción con proteínas relacionadas con el control del ciclo celular como p21 (Vairapandi et al. 1996, Azam et al. 2001) o con el complejo Cdk1/CiclinaB1 inhibiendo su actividad quinasa y bloqueando la progresión del ciclo (Zhan et al. 1999) de manera que la función que prevalezca sea la estimuladora en el crecimiento celular. Por tanto, el efecto de las proteínas de la familia *Gadd45* varía dependiendo de las condiciones en las que sean expresadas y del tipo celular.

La disminución de proliferación observada en los ratones deficientes de *Gadd45g* de 6-12 semanas daría lugar a una disminución en el porcentaje de células T reguladoras inducidas. Como lo observado es una disminución en el porcentaje de células T reguladoras en nódulos linfáticos y bazo de los ratones de 4-8 semanas, parece ser que esta disminución sería de las células T reguladoras naturales que se originan en el timo. Habría que utilizar otros marcadores como la Neuropilina-1 (para Treg naturales) o Hellios (para Treg inducidas) para poder confirmar esta conclusión y conocer así cuál de las dos poblaciones es la alterada. Los defectos de generación en el timo y la deficiente proliferación tienen consecuencias no solo en la función de las células sino también en su diferenciación a otras subpoblaciones celulares.

Una de las consecuencias de la falta de proliferación de los ratones deficientes es la falta de generación de células de memoria efectora y, así, se observa en la disminución del porcentaje de las células CD4 de memoria efectora en los nódulos linfáticos de los ratones de 6-12 semanas.

Dentro de las células efectoras, existen varios tipos de subpoblaciones de células dentro de las células CD4+. Las células Th1, Th2 y Th17 son importantes para la eliminación de patógenos intracelulares, helmintos y, bacterias y hongos extracelulares, respectivamente. La alteración de las células Th1 y Th17 también está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, mientras que las alteraciones en las células Th2 contribuyen a las respuestas alérgicas (Zhu et al. 2008) (revisado en (Zhu et al. 2010)). Se estudió la función de estas células en ratones deficientes para *Gadd45g* y wt. Para ello, se diferenciaron células CD4+ *in vitro*. Se observó una menor producción de IL2 y una menor producción de TNF α aunque no significativa. La menor producción de IL2, por parte de las células *Gadd45g*^{-/-}, podría contribuir a la menor proliferación observada previamente. Para profundizar en estos resultados, analizamos la activación de las MAPKs tras activación de las células con α CD3 a varios tiempos observándose una menor activación de p38 y mayor activación de JNK, lo cual se correlaciona con estudios publicados en los que la activación de p38 es clave en la activación de células T *naïve* pero no la JNK (Zhang et al. 1999). En otros estudios realizados en células Th1 diferenciadas *in vitro*, se observó una menor producción de IFN γ (Lu et al. 2001) y también una menor activación de p38 y JNK. En células THP-1 (línea celular de

monocitos) se ha visto que *Gadd45g* está implicado en la producción de TNF α e IL6 tras estimulación con LPS y que es necesario para la actividad de JNK (Shin et al. 2012). Las diferencias en la producción de citoquinas podrían deberse a las distintas condiciones de diferenciación y de medición de las citoquinas. El hecho de que *Gadd45g* sea más relevante en la función de las células Th1 que en las Th2 puede explicarse teniendo en cuenta que *Gadd45g* se expresa con mayor intensidad en las primeras, porque su inducción es a través de IL2 que es la citoquina que da lugar a este tipo celular. Además, p38 no desempeña un papel importante en las células Th2 (Rincon 1998) y por tanto la menor activación de p38 en células deficientes en *Gadd45g* no tiene un efecto relevante en este tipo celular. Con esto queda de manifiesto la importante función de *Gadd45g* en la función de las células Th1.

En células CD4+ diferenciadas a Th17 *in vitro*, observamos una mayor producción de IL17 tanto en células *Gadd45g*^{-/-} estimuladas con α CD3, como con α CD3 y α CD28. Las células Th17 están relacionadas con protección contra patógenos extracelulares e implicadas en la progresión de enfermedades autoinmunes (revisado en (Bettelli et al. 2007)). Se ha visto que ratones deficientes en IL17 o tratados con antagonistas de la misma son resistentes al desarrollo de artritis inducida con adyuvantes; también desarrollan de manera más tardía y con menor severidad encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE). Se ha estudiado el desarrollo de EAE en ratones deficientes en *Gadd45b*, en este modelo, a pesar de esperarse un desarrollo más leve de la enfermedad, los ratones *Gadd45b*^{-/-} desarrollan una versión exacerbada de la enfermedad en comparación con ratones control (Liu et al. 2005). Sin embargo, en estudios de inducción de artritis con colágeno, los ratones *Gadd45b*^{-/-} desarrollaron la enfermedad de manera más leve en comparación con los ratones control (Luo et al. 2011). En este estudio se analizó la diferenciación *in vitro* de células obtenidas de nódulos linfáticos tras inmunización con colágeno a Th17 sin observarse diferencias entre ratones deficientes y control; sin embargo, tras cultivar células de nódulos linfáticos y bazo tras inmunización con colágeno de células deficientes en *Gadd45b* y control, se observó una menor producción de IL-17 por parte de las células deficientes en comparación con células control. Además, se observó una mayor producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y una mayor presencia de células T reguladoras en los

ratones *Gadd45b*^{-/-}. Parece que el efecto de *Gadd45b* en este tipo de enfermedades depende del modelo. Sería interesante analizar el papel de *Gadd45g* en este tipo de enfermedades, puesto que en principio esperaríamos obtener enfermedades con un desarrollo más exacerbado en ratones deficientes en *Gadd45g* teniendo en cuenta los resultados en células Th17, pero podrían encontrarse atenuadas si el efecto observado predominara una respuesta Th1, que en los ratones *Gadd45g*^{-/-} se encuentra afectada.

En resumen, los ratones *Gadd45g*^{-/-} presentan leves anormalidades en el sistema inmunitario que apuntan a un papel fundamental de *Gadd45g* en la generación de timocitos y en el desarrollo de la respuesta efectora hacia las células Th1 y Th17. Este papel sería por su interacción con las proteínas de la cascada de activación de las MAPKs importantes para la selección positiva y negativa, y para el desarrollo de los linfocitos Th1. Sería conveniente realizar ensayos de inducción de enfermedad, como inducción de artritis o EAE, o diferentes tipos de infección. A la vista de estos resultados, *Gadd45g* podría estar implicado en un peor pronóstico en enfermedades de tipo inflamatorio debido a su implicación en las respuestas Th1 y Th17. Además, también podría estar implicado en una respuesta insuficiente frente a patógenos debido a la menor producción de IL2 que podría repercutir en una menor proliferación y que, finalmente, podría causar una disminución en la generación de células efectoras y células de memoria, como podría indicar el descenso en células de memoria que observamos en los ratones adultos. *Gadd45g* parece ejercer una función más importante en el desarrollo de la respuesta inmune que en la homeostasis del sistema inmunitario.

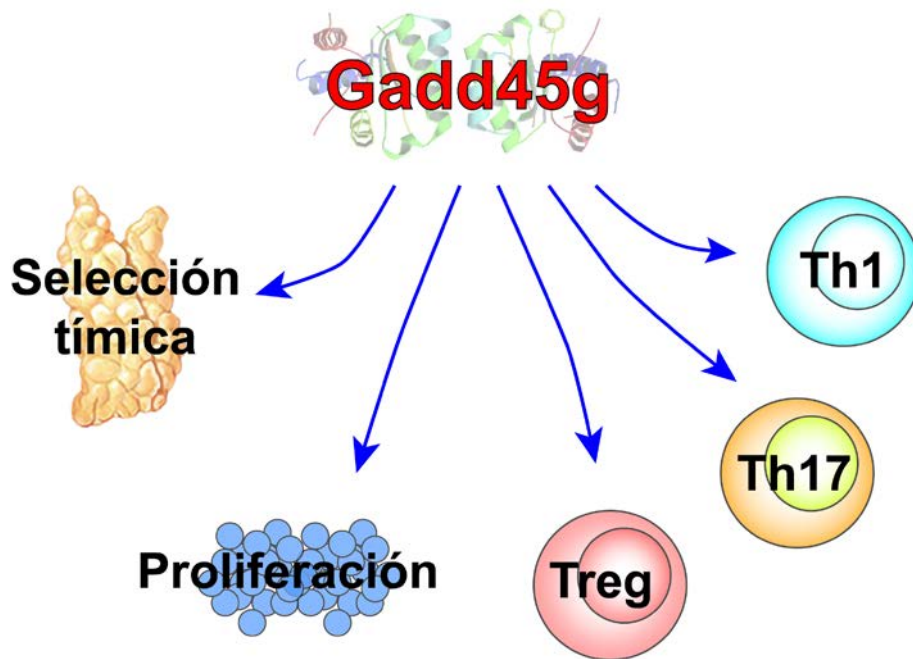


Figura D1. Funciones en las que *Gadd45g* tiene un papel clave. Gadd45g es necesario para que los procesos de selección positiva y negativa tengan lugar correctamente. Gadd45g es un regulador positivo de proliferación. La ausencia de Gadd45g provoca una menor frecuencia de células Treg. Gadd45g es necesario para la función de los linfocitos Th1. La ausencia de Gadd45g provoca una activación exacerbada de las células Th17.

2. *Gadd45g* en el desarrollo embrionario.

La determinación del sexo responde a un complejo programa de expresión génica que culmina con la generación de una gónada bien diferenciada y el desarrollo de las características fenotípicas típicas de cada sexo. Muchos de los genes implicados en este proceso se han conocido gracias al estudio de individuos con problemas de fertilidad y fenotipos sexuales atípicos. De hecho, la infertilidad ha supuesto una dificultad añadida en las investigaciones al impedir establecer pedigrís para localizar las mutaciones genéticas que causan los fenotipos anómalos. Sin embargo, algo positivo en el abordaje de la determinación del sexo es su elevada conservación entre humanos y modelos murinos. Esto ha permitido disponer de diversos modelos murinos de enfermedad debidos a anomalías en la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario. En algunas ocasiones, el descubrimiento de los genes involucrados en la determinación del sexo ha sido accidental, es decir, resultado colateral de estudiar en ratones la deficiencia causada por genes asociados inicialmente en exclusiva a otras funciones. En nuestro caso hemos analizado los ratones deficientes en *Gadd45g* esperando el desarrollo espontáneo de patologías autoinmunes o cáncer, pero no sospechábamos su relevancia en la determinación del sexo y el desarrollo de gónadas masculinas.

Dentro del relativo desconocimiento sobre el papel de la familia de proteínas *Gadd45* en desarrollo embrionario, se ha atribuido a las isoformas *Gadd45a* y *Gadd45g* una función en el desarrollo del cerebro favoreciendo la diferenciación neuronal (Kaufmann et al. 2011). Sin embargo, quedan aún por resolver multitud de preguntas. En este trabajo, nosotros aportamos luz sobre la relevancia de cada uno de los tres miembros de la familia *Gadd45* en el desarrollo gonadal y la determinación del sexo.

Tras estudiar una colonia de más de 600 ratones deficientes en *Gadd45a* y/o *Gadd45b* en combinación con deficientes para *Gadd45g*, podemos concluir que *Gadd45a* y *Gadd45b* son completamente dispensables durante la determinación del sexo. Su ausencia no causa ninguna alteración en la frecuencia de nacimientos de ratones de ambos sexos y su presencia no se detecta en el periodo crítico de determinación sexual en gónadas de ratones silvestres. Por el contrario, podemos concluir que la expresión de *Gadd45g* es fundamental para inducir el programa de

desarrollo de gónadas sexuales masculinas. De hecho, su ausencia provoca el mantenimiento por defecto del programa sexual para el desarrollo de gónadas femeninas y, por tanto, la generación de ratones únicamente con fenotipo femenino. Este efecto no solo es claramente visible en ratones con fondo genético C57BL/6 (para los que se ha descrito una mayor sensibilidad a defectos en la cascada de determinación del sexo masculina), sino que las anomalías también se detectan en ratones con otros fondos genéticos (como el mixto 129-C57BL/)

La expresión de *Gadd45g* comienza alrededor del tiempo en el que los embriones de ratón presentan 8 somitos en la cola, tanto en gónadas masculinas como femeninas, y aumenta hasta alcanzar el máximo nivel al tiempo de los 18 somitos de la cola, para luego decaer progresivamente. Hemos observado que la expresión de *Gadd45g* precede en el tiempo a la expresión del gen *Sry* (Hacker et al. 1995, Bullejos et al. 2001, Hiramatsu et al. 2009). Este hecho sugiere que la presencia de GADD45g podría ser necesaria para la expresión de *Sry*. De hecho, así lo hemos demostrado puesto que en los ratones XY deficientes en *Gadd45g* no se detecta al tiempo esperado la expresión del gen *Sry*; ni tampoco, como consecuencia, se detecta la expresión posterior de *Sox9* o *Amh*. Además, destacamos de nuestro estudio la observación de que no existe una expresión diferencial de *Gadd45g* entre machos y hembras, a pesar de que *Gadd45g* solo es necesario para el programa de diferenciación masculino y su ausencia no provoca ningún defecto en el desarrollo femenino. *Gadd45g*, a pesar de ser necesario para la expresión de *Sry*, se podría expresar por igual en ambos sexos por ser también necesario para el establecimiento de la gónada bipotencial como ocurre con genes como *M33* (*Cbx2* (Katoh-Fukui et al. 1998, Katoh-Fukui et al. 2011)), *Sf1* (Luo et al. 1995, de Santa Barbara et al. 2001) y *Wt1(+KTS)* (Hossain et al. 2001), cuya ausencia provoca en muchos casos una reversión del sexo parcial o total y un desarrollo anómalo de las gónadas. Así mismo, se ha descrito otro tipo de proteínas, como GATA4 y FOG2 (Tevosian et al. 2002), que son necesarias tanto para el desarrollo testicular como para el desarrollo ovárico, o bien el caso de AMH, cuya expresión es necesaria para la regresión de los conductos de Müller en el desarrollo masculino pero también en el ovario adulto y la foliculogénesis (da Silva et al. 2010). Sin embargo, la clasificación de *Gadd45g* es excepcional porque no influye en el establecimiento de la gónada bipotencial y su ausencia permite la generación de

ovarios bien formados y aparentemente funcionales (con folículos en distintos estadios de desarrollo y cuerpos lúteos que indican que ha tenido lugar ovulación) incluso en individuos XY. Igualmente, parece exclusivo de *Gadd45g*, que a pesar de causar el problema de la reversión del sexo, no parece provocar ninguna otra patología aparente; mientras que en la mayoría de casos de reversión sexual, aparecen también otros síndromes asociados como son el síndrome de Sywer (asociado a neoplasias como gonadoblastoma y germinoma) (Kent et al. 2004, Zhu et al. 2011) (Salazar et al. 2006), de Fraiser (tumor de Wilms, aniridia, retraso mental...) (Saylam et al. 2003) (Martín Campagne et al. 2006) o de Denys-Drash (tumor de Wilms y glomerulopatías) (Guaragna et al. 2010). Por tanto, nuestro trabajo (presentado en esta Tesis y en Plos One, (Johnen et al. 2013)) y consistentemente con lo publicado simultáneamente por otros autores ((Gierl et al. 2012) (Warr et al. 2012)) revela que *Gadd45g* tiene una función crítica y exclusiva en el la determinación del sexo masculino a través de la regulación de la expresión de *Sry*, sin descartar que pueda tener alguna otra función reguladora más abajo en la cascada de señalización de determinación sexual masculina. Además, *Gadd45g* parece no tener ningún papel en la función en la gónada femenina, al menos en su formación y función inicial.

Respecto al mecanismo de acción de *Gadd45g* sobre *Sry*, se podría especular que teniendo en cuenta la reciente implicación de GADD45g en el proceso de demetilación de promotores (proceso necesario para que un gen pueda ser expresado) (Niehrs et al. 2012), y que el primer evento relacionado con la determinación masculina del sexo es la demetilación del promotor de *Sry*, y que la expresión de *Gadd45g* es previa a la de *Sry*, se desprendería que GADD45g podría ser necesario para la activación del promotor de *Sry* y que su ausencia provocaría que *Sry* permaneciera silenciado. Esta hipótesis ha sido descartada por estudios recientes en los que se ha comprobado que la demetilación del gen *Sry* se lleva a cabo de forma normal en ratones deficientes en *Gadd45g* (Gierl et al. 2012). Por otro lado, también se ha especulado que la acción de *Gadd45g* sobre *Sry* se debe a la integración de ambas moléculas a distintos niveles en la ruta de señalización de *Map3k4*. Por un lado, se ha descrito que la ausencia de *Map3k4* da lugar a reversión del sexo y a defectos del tubo neural. GADD45g se une al dominio amino-terminal y autoinhibitorio de MAP3K4 provocando su liberación y la

activación de la proteína (Mita et al. 2002). Por otro lado, *Sry* es una diana de la cascada de señalización de la MAPK p38 (Gazel et al. 2008) que está por debajo de MAP3K4 en su misma ruta. Gierl et al y Warr et al, sugieren que GADD45g puede activar a MAP3K4 que a su vez podría fosforilar y activar a p38 a través de la ruta de MAPKKs. P38 podría a su vez fosforilar y activar a GATA4 que es necesaria para la expresión de *Sry* (Gierl et al. 2012, Warr et al. 2012). Estos autores muestran que la ausencia de GADD45g da lugar a una bajada en la activación de p38 y GATA4 de alrededor de un 30%, y que esta variación es suficiente para provocar una alteración drástica del desarrollo gonadal. Sin embargo, este dato abre la puerta a especular que quizá haya todavía otros factores implicados en el proceso. De hecho, GADD45g es capaz de interactuar con multitud de otras proteínas (revisado en (Salvador et al. 2013)), muchas de ellas factores de transcripción como PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) o ESR1 (*estrogen receptor 1* (Yi et al. 2000)) De esta forma, cabe la posibilidad de que *Gadd45g* esté ejerciendo su efecto sobre la expresión de *Sry* a varios niveles, no solo activando directamente a la MAP3K4 sino también activando directamente a factores de transcripción (como podrían ser WT1 o SF1) que pueden actuar de distintas formas sobre la cascada de determinación masculina. De hecho, se ha descrito que en ratones deficientes para los receptores *Igf1* de insulina, que presentan reversión del sexo, la expresión de *Gadd45g*, *p38β* y *Sry* está muy disminuida (Pitetti et al. 2013). Resumiendo, y a la vista de todos estos datos, se podría hipotetizar que la cascada de eventos que lleva a la expresión de *Sry* podría ser la siguiente: INSR/IGFR1 -> GADD45G -> MAP3K4 -> MAP2K? -> p38α/β -> GATA4 -> *Sry*. En este trabajo queda claramente establecida la necesidad de la presencia de GADD45g para una correcta expresión de SRY y la determinación masculina del sexo (Figura D2).

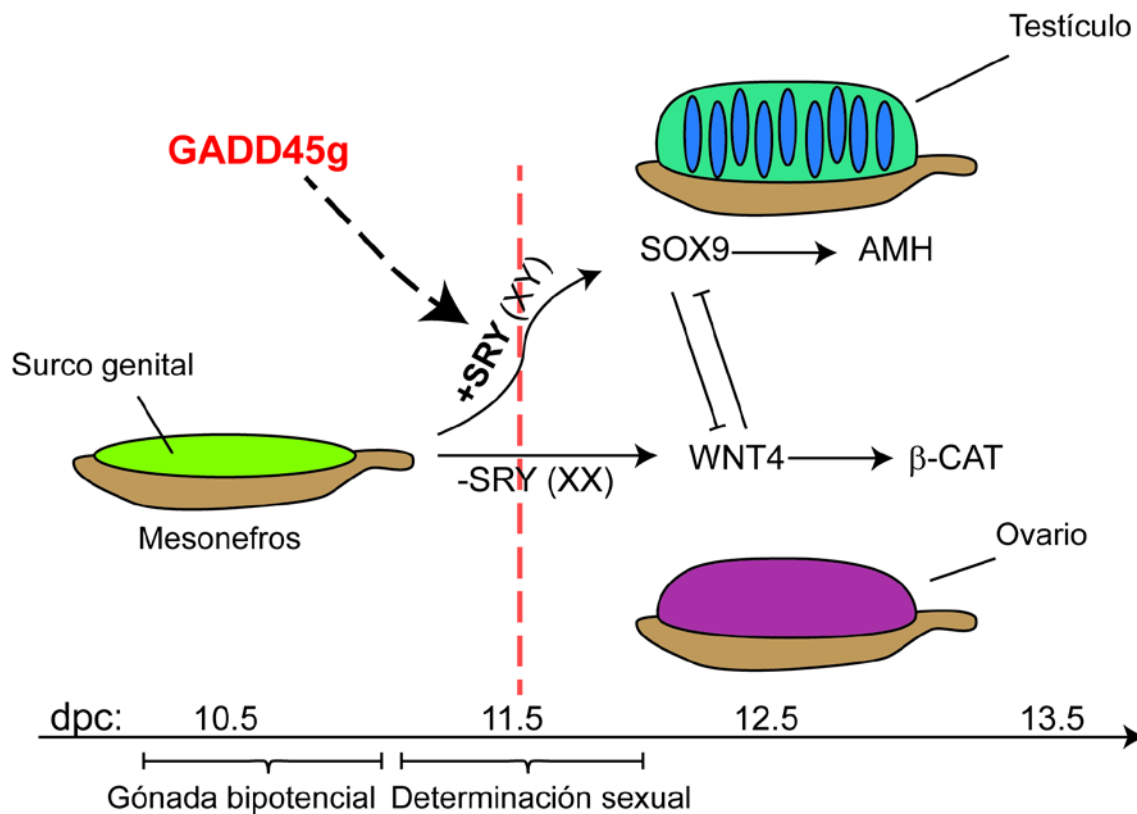


Figura D1. Modelo propuesto de acción de Gadd45g en la determinación del sexo. En ausencia de SRY (gónadas XX), la expresión es dirigida por el programa de determinación femenino (como la cascada de WNT4/beta-catenina) y da lugar a la formación de las células de granulosa y la formación del ovario. En las gónadas XY, la expresión de SRY a 11.5 dpc induce la expresión de SOX9, la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de los cordones testiculares. En machos, la AMH producida por las células de Sertoli induce la regresión de los conductos de Müller, y la testosterona induce la diferenciación de los conductos de Wolff a vasos deferentes, vesículas seminales y epidídimo. En los ratones deficientes en Gad45g, la expresión de SRY en las gónadas XY no alcanza en nivel necesario para la diferenciación testicular.

Es importante mencionar que en el momento de escribir esta Tesis no se cuenta con ningún dato relativo a la descripción de mutaciones en el gen *Gadd45g* en humanos. Teniendo en cuenta que solo se conoce la causa molecular de alrededor del 20% de los casos de DSD (Hughes et al. 2006), cabe especular que quizá *Gadd45g* esté involucrado en algunos de los casos DSD de etiología dada por desconocida.

Dada la importancia que un anormal desarrollo de los órganos sexuales puede tener en la vida un individuo, tanto por sus consecuencias patológicas como psicosociales, es fundamental seguir investigando en las bases moleculares de los DSD. Solo así se

podrán conocer las mejores dianas para el desarrollo de posibles terapias genéticas o químicas, así como establecer un adecuado diagnóstico y un completo consejo genético familiar. Igualmente, consideramos esencial llevar a cabo una labor social de divulgación científica que haga participe a todos los sectores de la sociedad de los avances realizados en el terreno de la determinación sexual, ya que creemos que el conocimiento general de que determinados DSD ayudaría a una mejor integración de estos individuo y a la mejora de su calidad de vida.



Conclusiones



Conclusiones

1. *Gadd45g* en el Sistema inmunitario.
 - 1.1. El ratón deficiente en *Gadd45g* no desarrolla patologías de tipo autoinmune o cáncer de manera espontánea a lo largo de su vida.
 - 1.2. Los ratones deficientes en *Gadd45g* presentan timomegalia en los primeros meses de vida con una alteración de las poblaciones tímicas, SP CD4 y DN, debido a defectos en la señalización de las MAPKs durante la selección positiva y negativa que se refleja en una activación defectuosa de p38 y JNK.
 - 1.3. *Gadd45g* es un regulador positivo de proliferación en células T.
 - 1.4. La funcionalidad de las células Th1 y Th17 se encuentra afectada en los ratones deficientes en *Gadd45g* conduciendo a una menor producción de la citoquina IL-2 y a una mayor producción de IL-17, respectivamente. Este defecto puede deberse a que *Gadd45g* es necesario para una correcta activación de las MAPKs p38 y JNK, ya que su ausencia conduce a una menor activación de p38 y una mayor activación de JNK.
2. *Gadd45g* es clave en la determinación del sexo.
 - 2.1. Los ratones deficientes en *Gadd45g* sufren una reversión, completa o parcial, del sexo de macho XY a hembra XY en función del fondo genético. En el caso del fondo puro C57BL/6, la reversión del sexo es completa y no se observa ningún síndrome asociado.
 - 2.2. La expresión de *Gadd45g* tiene lugar en gónadas, tanto masculinas como femeninas, durante el periodo crítico en la determinación del sexo, siguiendo un patrón de expresión similar al de *Sry*. Su expresión está restringida al tejido gonadal, estando ausente en el mesonefros.
 - 2.3. *Gadd45a* y *Gadd45b*, a pesar de su similitud con *Gadd45g*, no se expresan en la gónada embrionaria y no desempeñan papel alguno en la determinación del sexo.
 - 2.4. *Gadd45g* es necesario para el inicio de la cascada de determinación sexual masculina, induciendo de manera indirecta la expresión del gen *Sry*. Su ausencia provoca un bloqueo en esta cascada impidiendo la expresión de *Sry* y

su diana directa, *Sox9*, y del resto de genes masculinos, lo que causa en último término la reversión sexual de macho a hembra XY.

Anexo





Gadd45g Is Essential for Primary Sex Determination, Male Fertility and Testis Development

Heiko Johnen¹, Laura González-Silva¹, Laura Carramolino², Juana Maria Flores³, Miguel Torres², Jesús M. Salvador^{1*}

¹ Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Cantoblanco, Madrid, Spain,

² Department of Cardiovascular Development and Repair, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain, ³ Animal Surgery and Medicine Department, Veterinary School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

In humans and most mammals, differentiation of the embryonic gonad into ovaries or testes is controlled by the Y-linked gene *SRY*. Here we show a role for the Gadd45g protein in this primary sex differentiation. We characterized mice deficient in Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g, as well as double-knockout mice for Gadd45ab, Gadd45ag and Gadd45bg, and found a specific role for Gadd45g in male fertility and testis development. *Gadd45g*-deficient XY mice on a mixed 129/C57BL/6 background showed varying degrees of disorders of sexual development (DSD), ranging from male infertility to an intersex phenotype or complete gonadal dysgenesis (CGD). On a pure C57BL/6 (B6) background, all *Gadd45g*^{-/-} XY mice were born as completely sex-reversed XY-females, whereas lack of Gadd45a and/or Gadd45b did not affect primary sex determination or testis development. *Gadd45g* expression was similar in female and male embryonic gonads, and peaked around the time of sex differentiation at 11.5 days post-coitum (dpc). The molecular cause of the sex reversal was the failure of *Gadd45g*^{-/-} XY gonads to achieve the *SRY* expression threshold necessary for testes differentiation, resulting in ovary and Müllerian duct development. These results identify *Gadd45g* as a candidate gene for male infertility and 46,XY sex reversal in humans.

Citation: Johnen H, González-Silva L, Carramolino L, Flores JM, Torres M, et al. (2013) Gadd45g Is Essential for Primary Sex Determination, Male Fertility and Testis Development. PLoS ONE 8(3): e58751. doi:10.1371/journal.pone.0058751

Editor: Yann Herault, IGBMC/ICS, France

Received: December 11, 2012; **Accepted:** February 5, 2013; **Published:** March 13, 2013

Copyright: © 2013 Johnen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the European Research Council (ERC; FP7-208250-1), the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, PI081718, PI1101411), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (2008201109) to JMS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jmsalvador@cnb.csic.es

Introduction

The Gadd45 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45) family members Gadd45a, -b and -g are small nuclear and cytoplasmic proteins that bind to and modify the activity of other intracellular proteins, including p21 [1,2], PCNA [1,2], CRIF [3], CDK1 [4] and the MAP kinases p38 [5] and MAP3K4 [6]. They are implicated in the regulation of apoptosis, survival, senescence, cell cycle control, DNA repair and the response to physiological or environmental stress in mammalian cells. All family members appear to have overlapping but non-identical functions and binding partners, and are induced by different stimuli [7]. Little is known of their role in embryonic development. It was suggested that loss of an enhancer region that drives brain-specific Gadd45g expression leads to increased growth of brain regions in humans compared to chimpanzees [8]. Another group studied the expression pattern during mouse embryonic development up to 10.5 dpc and proposed a conserved role for Gadd45g in vertebrate neurogenesis [9] as well as involvement in embryonic neural cell development and exit from pluripotency in *Xenopus* [10].

Here we identify a specific role for Gadd45g in mammalian sex determination. In male gonads, *SRY* expression triggers differentiation of a somatic support cell lineage into Sertoli cells, which direct the male developmental pathway [11]; in the absence of *SRY* (in XX gonads), granulosa cells differentiate and the female

developmental pathway is activated [12]. These pathways are mutually antagonistic, and disturbances in their molecular network can lead to sex reversal and other disorders of sexual development. We found that Gadd45g, but not Gadd45a or Gadd45b, is necessary for activation of the male sex-determining pathway in mice and its absence leads to development of female gonads. Lack of Gadd45g decreased *SRY* expression, resulting in ovary and Müllerian duct development, whereas lack of Gadd45a and/or Gadd45b had no effect on testis development.

Materials and Methods

Mouse Strains and Genotyping

Gadd45a^{-/-} [13] and Gadd45b^{-/-} mice [14] were generated on a mixed 129/C57BL/6 genetic background. Gadd45g^{-/-} mice were generated by Drs. J.M. Salvador and C. Hollander on a mixed 129/C57BL/6 genetic background (Fig. S1) [15]. Mice were maintained in the CNB animal facility. Gadd45a^{-/-}, Gadd45b^{-/-}, and Gadd45g^{-/-} mice on a pure C57BL/6 background were generated by backcrossing for seven generations. We mated Gadd45a^{-/-} mice with Gadd45b^{-/-} and Gadd45g^{-/-} mice and intercrossed F1 double heterozygotes to obtain double-null mice. Mouse embryos were obtained by timed mating of Gadd45g^{-/-} or Gadd45g^{+/-} females with Gadd45g^{+/-} males. For embryo staging, midday on the day of vaginal plug

appearance was considered 0.5 dpc. Embryos were staged more accurately by counting tail somites posterior to the hind limb bud. Genotyping was done by PCR using the following primers: Gadd45g 5'-GCTGTGCTTTCCGGAAGTGA-3', 5'-CGGCAGATTGAGGCT GTGT-3' and 5'-AGTTGCCAGC-CATCTGTTGT-3'; SRY 5'-TCTTAAACTCTGAAGAAG AGAC-3' and 5'-GTCTTGCTGTATGTGATGG-3'. Experiments were approved by the CNB Ethical Committee, and mice were handled according to national and European Union animal care standards.

Isolation of Fetal Gonads from Embryos of Timed-pregnant Mice

Dissection was carried out around noon each day. Pregnant females were sacrificed and embryos extracted. Gonads (including mesonephros) from embryos at different stages were isolated, fixed in 4% paraformaldehyde (1 h) and stored in methanol at -80°C or flash frozen for RNA extraction [16].

Histological Analysis and Immunohistochemistry

Ovaries and testes from adult mice were fixed in 10% formalin, dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene and embedded in paraffin wax. Embedded samples were sectioned and hematoxylin/eosin-stained. Gonads were whole-mount stained with anti-SOX9 (sc 20095), -AMH (sc-6886, both from Santa Cruz,) and -PECAM-1-FITC antibodies (Pharmingen). Gonads were rehydrated with TBS, incubated in blocking buffer (1 h), stained with antibodies (overnight, 4°C), mounted with Vectashield Hardset (Source) and analyzed using a Leica TCS SP5 confocal microscope and LAS AF imaging software.

Quantitative PCR

RNA was extracted from both embryonic gonads (including mesonephros) using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 100 ng RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems). SRY and Gadd45g transcript amounts were quantified using the Taqman gene expression assays Mm00441712_s1 (SRY) and Mm00442225_m1 (Gadd45g)(Applied Biosystems) on an MWG AG BIOTECH Primus 96 thermocycler. All results were normalized to 18S (Fwd: 5'-GAGAAACGGCTACCACATCC-3'; RV: 5'-GGGTCCGGAGTGGGTAAT-3') housekeeping gene transcripts. In all negative controls (cDNA from female gonads and male no-RT controls), no SRY transcripts were detected.

Results

Complete or Partial XY Sex-reversed Phenotype of XY Gadd45g^{-/-} Mice

The complete absence of male Gadd45g-deficient mice on the B6 background and the presence of ambiguous genitalia (vagina imperforata, micropenis, abnormal anogenital distance) in some Gadd45g^{-/-} mice on a mixed 129/B6 background prompted us to analyze their genetic sex by PCR amplification of the *SRY* (sex-determining region Y) gene on the Y chromosome. *Gadd45g* deletion did not result in a male-specific lethal phenotype, but the majority of XY Gadd45g^{-/-} mice on the 129/B6 background and all XY Gadd45g^{-/-} mice on the pure B6 background were born as sex-reversed XY females (XY-F) (Fig. 1).

On the B6 background, the external and internal reproductive organs of adult Gadd45g^{-/-} XY-F mice (Fig. 1C,I) were morphologically indistinguishable from those of wild type females

(Fig. 1B,H), and histological analysis of the gonads revealed no obvious abnormalities. Hematoxylin/eosin-stained ovaries from all B6 XY-F mice analyzed had oocytes and follicles at different developmental stages (Fig. 1O,U). Corpora lutea (Fig. 1U) were found in all ovaries, indicating that ovulation took place in B6 XY-F mice.

In contrast, the internal and external reproductive organs of 129/B6 Gadd45g^{-/-} XY mice showed a range of DSD that could be broadly categorized in three groups. In the first group, mice had a male phenotype and reproductive system (XY-M), although with testis hypoplasia (Fig. 1D,J). All fertility-tested Gadd45g^{-/-} XY-M mice were infertile. Histological analysis showed hypoplastic seminiferous tubules with reduced spermatogenesis and interstitial cell hyperplasia (frequent in infertility; Fig. 1P). No spermatozoa were found in the cauda epididymis and vas deferens (Fig. 1V). Mice in the second group had a female phenotype and reproductive system (XY-F, Fig. 1E,K). These mice had female reproductive organs (ovary, oviduct, uterus), although the ovaries usually contained mainly interstitial cells and multiple primordial follicles, but no other stages of oocyte and follicle development (Fig. 1Q,W). All fertility-tested XY-F mice were infertile. The third group consisted of intersex mice (XY-intersex, Fig. 1F,L) with male, female, or ambiguous external genitals and internal reproductive organs with both female and male characteristics. For example, one side developed a hypoplastic testes/epididymis/vas deferens (Fig. 1L) and the contralateral side, an ovary/oviduct/uterus or an ovotestis with mixed ovarian and testicular tissue in the same gonad (Fig. 1L,R,X).

The cause for the variability of this phenotype is likely to be the variable contribution of the B6 background in individual mixed-background mice. Compared to the 129 strain, B6 mice are more responsive to disturbances in early testis development [17]. As a result, all B6 Gadd45g^{-/-} XY, and a small number of B6 Gadd45g^{+/-} XY mice showed complete sex reversal (Fig. 2A), whereas some 129/B6 Gadd45g^{-/-} XY mice still developed as (infertile) males (Fig. 2B). Chromosome painting of metaphase X and Y chromosomes confirmed that mice identified as XY-F by PCR (Fig. 2C) carried the Y chromosome (Fig. 2D).

We evaluated the role of Gadd45a and/or Gadd45b in testis development and sex determination. Analysis of >600 single- and double-knockout mice showed that the XY sex reversal is caused by the Gadd45g deletion, independent of the Gadd45a or Gadd45b genotype (Table 1).

Lack of Sertoli Cell Differentiation and Testis Cord Formation in B6 XY Gadd45g^{-/-} Gonads

We tested whether lack of Gadd45g affects key molecular pathways during the time window for gonadal sex differentiation in mice [18,19]. At day 10 dpc, the gonads arise from the genital ridge on the surface of the mesonephros. At this stage, they contain bipotential somatic and germ cells that can follow the male or female pathway. In XY gonads, *SRY* expression by a somatic supporting cell lineage (pre-Sertoli) induces *SOX9* expression (Fig. 3A,D,G,J), resulting in Sertoli cell differentiation and testis development. Starting at 13.5 dpc, Sertoli cell-derived AMH (anti-Müllerian hormone) (Fig. 3G,J) inhibits development of the Müllerian ducts in the male embryo, and testes-derived testosterone directs development of the adjacent Wolffian duct into epididymis, vas deferens and seminal vesicles. In the absence of *SRY* in XX gonads, *SOX9* is downregulated (Fig. 3B,E,H,K) and a female-specific gene expression program is activated, leading to differentiation of the somatic supporting lineage into granulosa cells, which support oocyte development [18]. We observed a striking decrease in the number of *SOX9*-positive somatic cells in

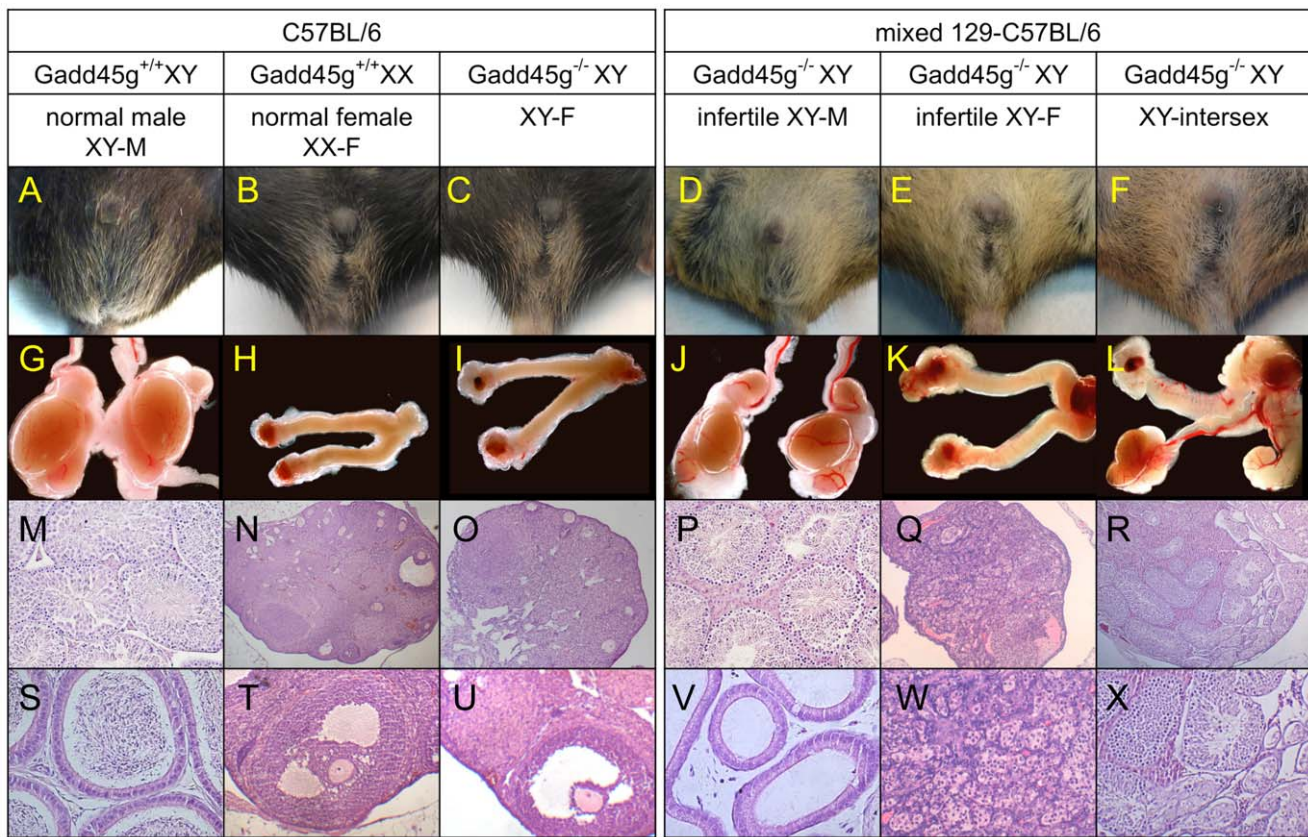


Figure 1. Complete or partial XY sex-reversed phenotype of XY *Gadd45g*^{-/-} mice on a pure B6 or mixed 129/B6 background. (A–F) External genitalia, (G–L) internal reproductive organs (8x magnification), and (M–X) hematoxylin/eosin (HE)-stained gonad or epididymis sections from young adult *Gadd45g*^{-/-} and wild type mice. External and internal (C,I) reproductive organs from B6 *Gadd45g*^{-/-} XY female mice (XY-F) are morphologically indistinguishable from wild type females (B, H). HE-stained ovaries from all B6 XY-F mice appear normal and contain oocytes and follicles at different maturation stages (O), including antral follicles with oocytes (U). Corpora lutea are found in XX-F and XY-F ovaries (N,O,T,U). In contrast, a large spectrum of disorders of sexual development (DSD) is seen in *Gadd45g*^{-/-} XY mice on the 129/B6 background, which can be divided into three groups. 1) Infertile XY-females (E) with female internal reproductive organs (ovary, oviduct, uteri) (K), although the ovaries usually contain only primordial follicles and interstitial cells (Q,W). 2) Infertile XY-males with male phenotype (D) and reproductive system (J); testis, epididymis, vas deferens and seminal vesicles [not shown in J]) with hypoplastic testis (compare J to G). Seminiferous tubules showed reduced spermatogenesis and interstitial cell hyperplasia (P), and no spermatozoa were present in the cauda epididymis (V) and vas deferens. 3) XY-intersex mice (F) with male and female characteristics. External genitalia were male, female, or ambiguous (as in F). One side often developed a hypoplastic testis/epididymis/vas deferens (L) and the contralateral gonad, a uterus and a hypoplastic ovary/oviduct/uterus or an ovotestis with mixed ovarian and testicular tissue (L,R,X). Magnification: 5x (N,O,Q,R) or 10x (M,P,S,T,U,V,W,X). doi:10.1371/journal.pone.0058751.g001

Gadd45g^{-/-} XY gonads (Fig. 3C,F) compared to wild type controls (Fig. 3A,D). Testis cord formation and AMH expression were not observed (Fig. 3I,L) and SOX9 was not detected after 12.5 dpc. The results indicated that *Gadd45g* exerts its effects on or before 12.5 dpc. Reduction of SOX9 expression causes primary male-to-female sex reversal in mice [20] and humans [21].

Gadd45g is Necessary for *SRY* Expression and Testis Development at the Time of Primary Sex Determination

We analyzed *Gadd45g* expression in male and female gonads during this period by quantitative PCR and found that, unlike many other molecules important for sex determination, the *Gadd45g* expression pattern was not sexually dimorphic. *Gadd45g* levels were similar in wild type XY and XX gonads during the sex determination period, and peaked at the time of primary sex differentiation (11.5 dpc, or 18 tail somites), when *SRY* is also expressed (Fig. 4A). Analysis of *Gadd45g* expression using microarray gene expression data downloaded from GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) also showed that *Gadd45g*

was detected at similar levels in both female and male gonads on day 11.5 dpc and declined thereafter (Fig. 4B) [22]. Data from another study using purified Sertoli/granulosa precursor cells (Fig. 4C) also showed similar *Gadd45g* expression in both sexes, and maximum levels at 11.5 dpc [23]. Microarray quantification of relative *Gadd45a* and *Gadd45b* levels showed lack of *Gadd45a* and *Gadd45b* expression in purified somatic supporting precursor cells (Fig. S2). Only *Gadd45g* expression was induced robustly in embryonic gonads and in somatic precursor cells at 11.5 dpc (Fig. S2B).

We used quantitative PCR to quantify *SRY* expression levels in B6 *Gadd45g*^{-/-} XY gonads compared to wild type XY controls, and found that the molecular cause of sex reversal was the failure of *Gadd45g*^{-/-} XY gonads to upregulate *SRY* (Fig. 4D). *Gadd45g*^{+/-} XY gonads showed a reduction in *SRY* expression at the 17–18 tail somite stage compared to wild type controls (Fig. 4E), although wild type *SRY* levels were detected thereafter. As a consequence, gonad development in all B6 *Gadd45g*^{-/-} XY

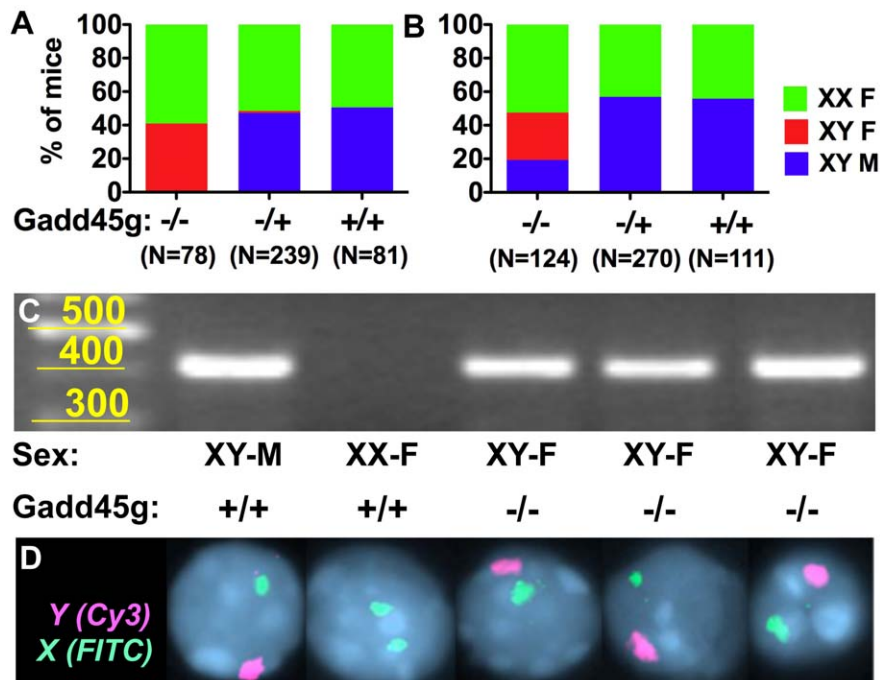


Figure 2. Frequency of sex reversal in distinct *Gadd45g* genotypes on 129/B6 or B6 backgrounds. (A) *SRY* genotyping showed that 100% of XY $Gadd45g^{-/-}$ and 3% of $Gadd45g^{+/-}$ mice on the B6 background, and (B) 80% of XY $Gadd45g^{-/-}$ mice on the 129/B6 background were born as sex-reversed XY females. (C) Sex reversal in $Gadd45g^{-/-}$ mice born as females was detected by PCR amplification of a 404-bp band from the Y chromosome *SRY* gene. (D) Presence of the Y chromosome in *SRY*-positive $Gadd45g^{-/-}$ XY-F mice was confirmed by chromosome painting (FISH). doi:10.1371/journal.pone.0058751.g002

mice and 3% of $Gadd45g^{+/-}$ XY mice followed the female developmental pathway (Fig. 2A, Fig. 4F).

Discussion

Our study shows that of the three members of the *Gadd45* family, *Gadd45g*, but not *Gadd45a* or *Gadd45b* is essential in testis development, male fertility and sex determination. We

characterized mice deficient in each of the *Gadd45* isoforms, as well as double-knockout mice for *Gadd45ab*, *Gadd45bg* and *Gadd45ag*, and found a specific role for *Gadd45g* in sex determination. Lack of *Gadd45g* decreased *SRY* expression and blocked *SOX9* expression, resulting in ovary and Müllerian duct development. The data indicate that *Gadd45g* is the only *Gadd45* family member that regulates *SRY* expression. Our results also emphasize the relevance of genetic background in mouse models

Table 1. Lack of *Gadd45g*, but not *Gadd45a* or *Gadd45b* leads to male-to-female sex reversal in mice.

| Gadd45a | Gadd45b | Gadd45g ^{-/-} | | | | Gadd45g ^{+/-} | | | | Gadd45g ^{+/+} | | | |
|---------------|---------|------------------------|------|------|-----------------|------------------------|------|------|-----------------|------------------------|-----|-----|-----------------|
| | | XX | XY* | XX | XY [§] | XX | XY* | XX | XY [§] | XX | XY* | XX | XY [§] |
| +/+ | +/+ | 45 | 24 | 65 | 35 | 79 | 0 | 100 | 0 | 173 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | +/+ | 12 | 7 | 63 | 37 | 13 | 0 | 100 | 0 | 81 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | +/+ | 2 | 1 | 67 | 33 | 4 | 0 | 100 | 0 | 23 | 0 | 100 | 0 |
| +/+ | +/- | 5 | 2 | 71 | 29 | 19 | 0 | 100 | 0 | 19 | 0 | 100 | 0 |
| +/+ | -/- | 5 | 5 | 50 | 50 | 6 | 0 | 100 | 0 | 16 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | +/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 38 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | -/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 37 | 0 | 100 | 0 |
| +/- | -/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 42 | 0 | 100 | 0 |
| -/- | +/- | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 30 | 0 | 100 | 0 |
| All genotypes | | 69 | 39 | 64 | 36 | 121 | 0 | 100 | 0 | 459 | 0 | 100 | 0 |

*The number of sex-reversed XY females in $Gadd45g^{-/-}$, $Gadd45g^{+/-}$ and $Gadd45g^{+/+}$ mice that also bear a hetero- or homozygous deletion of another *Gadd45* family member (*Gadd45a* or *Gadd45b*).

§The percentage of sex-reversed XY females in $Gadd45g^{-/-}$, $Gadd45g^{+/-}$ and $Gadd45g^{+/+}$ mice that also bear a hetero- or homozygous deletion of another *Gadd45* family member (*Gadd45a* or *Gadd45b*).

n.a., not available.

doi:10.1371/journal.pone.0058751.t001

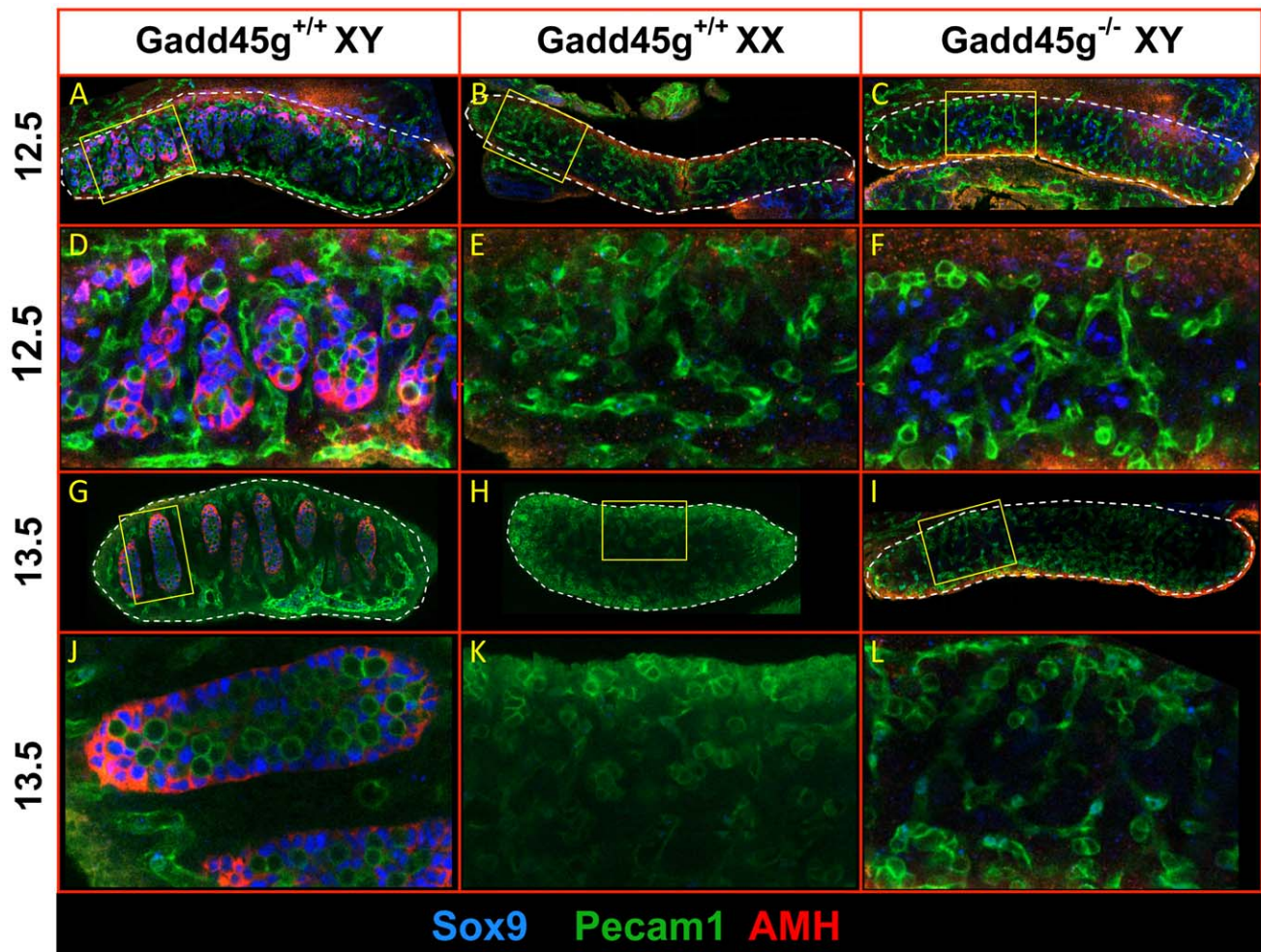


Figure 3. Lack of Sertoli cell differentiation and testis cord formation in XY *Gadd45g*^{-/-} gonads. (A–L) Confocal optical slices of whole mount immunostained B6 gonads (dashed outline), showing expression of Sertoli cell markers SOX9 (nuclear, blue) and AMH (cytoplasmic, red) and the germ/endothelial cell marker Pecam1 (membrane, green). (A) From 12.5 dpc, wild type male gonads can be distinguished morphologically from female gonads (B) by the appearance of testis cord structures containing SOX9-expressing Sertoli cells. (C) In *Gadd45g*^{-/-} XY gonads, only transient SOX9 expression was observed in a small number of somatic cells at 12.5 dpc. (D–F) and (J–L) are enlarged details of the images above. (G) At 13.5 dpc, all germ cells in male gonads are enclosed in testis cords and interact closely with a surrounding single layer of SOX9- and AMH-positive Sertoli cells. (H,I,K,L) No testis cord formation or AMH expression was induced in *Gadd45g*^{+/-} XX (H,K) or in *Gadd45g*^{-/-} XY (I,L) gonads.

doi:10.1371/journal.pone.0058751.g003

with sex reversal phenotype. We found a more pronounced phenotype in *Gadd45g*^{-/-} mice generated on the B6 than on the 129SvJ-C57/B6 background. Although other groups have developed *Gadd45g*^{-/-} mice, it is possible that sex reversal was not observed because most experiments used mutants on a pure 129SvJ or mixed 129SvJ-C57/B6 backgrounds.

Compared to the testis-determining pathways downstream of *SRY* in male and the ovary-determining pathways in female gonads, little is known of the pathways that regulate *SRY* itself (for a review, see [12]). The insulin receptor tyrosine kinase gene family (IGF1R, IR, IRR) [24], the transcription factor GATA4 and its co-factor FOG2 [25], the +KTS isoform of the WT1 transcription factor [26], as well as MAP3K4 [27] upregulate *SRY* expression. Many known biological functions of *Gadd45g* are mediated by its ability to bind and activate MAP3K4, a mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKKK). Bogani *et al.* reported male-to-female sex reversal in MAP3K4-deficient mice caused by decreased *SRY* expression, although embryos die pre- or perinatally due to unrelated developmental defects [27]. Sex

reversal was recently associated with reduced phosphorylation of p38 MAPK and GATA4, suggesting that *Gadd45g* is needed to promote MAP3K4-mediated activation of p38 signaling in murine embryonic gonadal somatic cells for testis determination [28;29]. It remains to be determined whether these factors alter *SRY* levels in individual cells or the proliferation of *SRY*-expressing cells, and how MAPK activation leads to increased *SRY* transcription.

Deletion of many of the genes that regulate *SRY* expression lead to embryonic or perinatal death in mice (e.g., GATA4, FOG2, or MAP3K4), or are accompanied by additional developmental complications in humans (for example, Frasier syndrome in patients with a mutant WT1 isoform); nonetheless, we detected no developmental defects other than sex reversal or infertility in *Gadd45g*^{-/-} mice. In humans, abnormal appearance of genital organs occurs in one of every 4500 births [30], and it is estimated that as many as 1.7% of live births show some degree of DSD [31]; infertility affects 10–15% of couples, with similar contributions from both sexes [32]. The genetic basis of human male-to-female sex reversal remains unexplained in the majority of cases. As there

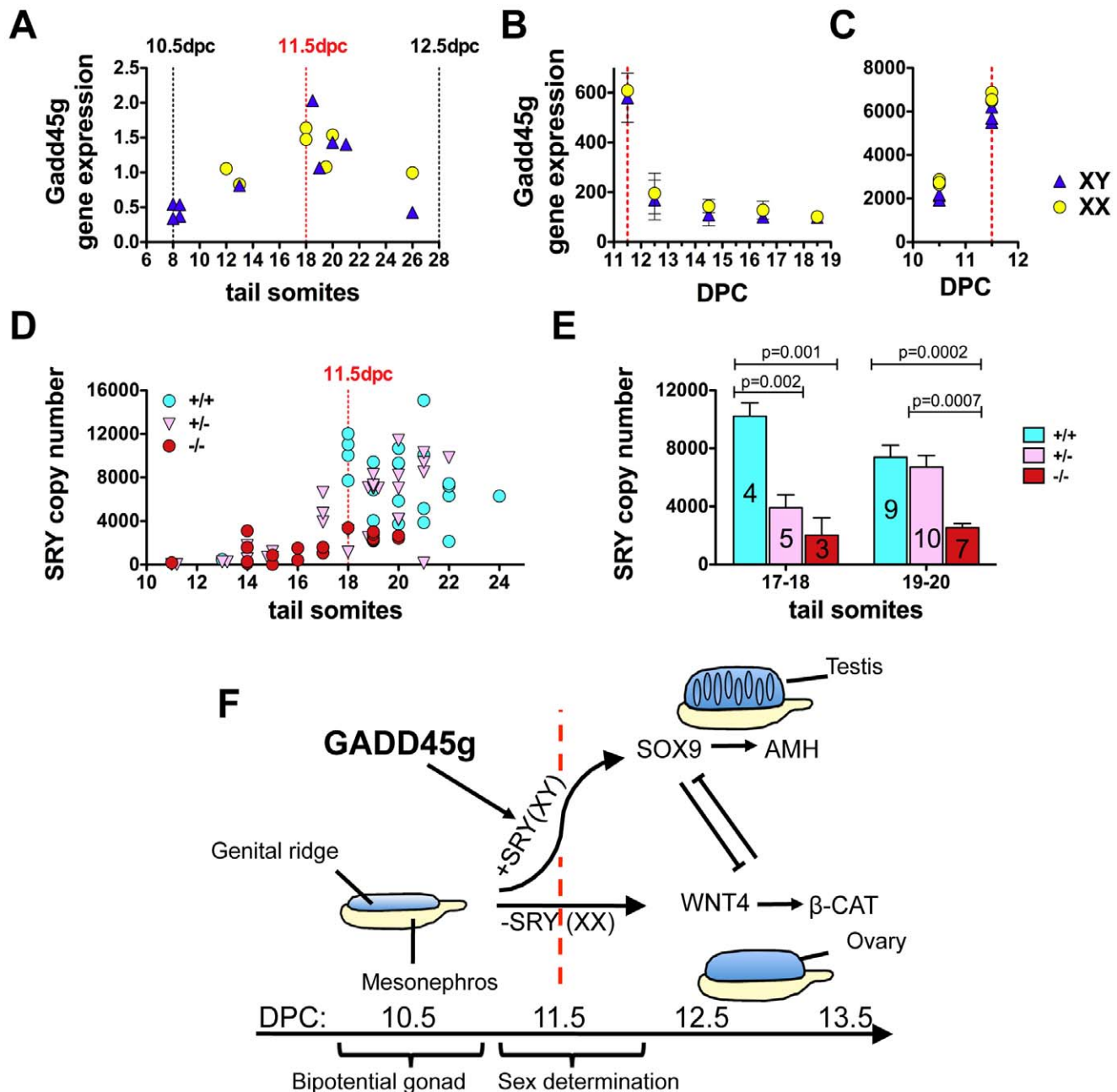


Figure 4. *Gadd45g* is necessary for *SRY* expression and testis development at the time of primary sex determination of the bipotential embryonic gonad. (A) RT-PCR quantification of relative *Gadd45g* expression in B6 wild type XX and XY embryonic gonads (including mesonephros), collected between 10.5 (8 tail somites) and 12.5 dpc (28 tail somites). In all images, the dashed red line denotes the point of maximal *SRY* expression (11.5 dpc or 18 tail somites). (B) Microarray quantification of relative *Gadd45g* expression in normal wild type XX and XY embryonic gonads (including mesonephros) from the time of the bipotential gonad (GEO data set GSE6916). (C) Microarray quantification of relative *Gadd45g* expression in purified somatic support precursor cells during the critical sex determination period (10.5–11.5 dpc) (GEO data set GDS1724). (D) RT-PCR quantification of *SRY* copy numbers in *Gadd45g*^{+/+}, *Gadd45g*^{+/-} and *Gadd45g*^{-/-} gonads (including mesonephros) between 10.5–12.5 dpc. (E) RT-PCR quantification (mean and SEM) of *SRY* copy numbers in *Gadd45g*^{+/+}, *Gadd45g*^{+/-} and *Gadd45g*^{-/-} gonads (including mesonephros) at the 17 to 21 tail somite stage. Statistical analysis (Student's t-test) of all data from Fig. 4D at the 17–18 or 19–20 tail somite stage showed reduced *SRY* expression in *Gadd45g*^{-/-} mice and delayed *SRY* upregulation in *Gadd45g*^{+/-} mice compared to wild type controls. Numbers for each group (*n*) are displayed in each column. (F) Main components of the transcriptional network around the time of primary sex determination and suggested mechanism of *Gadd45g* action. In the absence of *SRY* (XX gonads), female-specific genetic programs (such as the WNT4/beta-catenin pathway) direct differentiation of the somatic support lineage into granulosa cells and ovary development. In XY gonads, *SRY* expression at 11.5 dpc induces *SOX9* expression, Sertoli cell differentiation and testis cord formation. In males, Sertoli cell-derived anti-Müllerian hormone (AMH) induces Müllerian duct regression, and testosterone induces differentiation of the Wolffian duct into vas deferens, seminal vesicles and epididymis. AMH acts ipsilaterally, which explains the intersex phenotype shown in Fig. 1L. In *Gadd45g*-deficient mice, *SRY* expression in XY gonads fails to reach the threshold level necessary for testis differentiation. The dashed red line denotes the point of maximal *SRY* expression (11.5 dpc).

are no known descriptions of human Gadd45g^{-/-} individuals, it is currently not possible to determine whether the effect is the same or similar in man. The complete sex reversal phenotype in Gadd45g^{-/-} mice and the fact that Gadd45g is a key upstream activator of the master regulator SRY nonetheless suggest that it is a promising candidate gene in human non-syndromic male infertility and in partial or complete male-to-female primary sex reversal in 46, XY individuals.

Supporting Information

Figure S1 Generation of Gadd45g^{-/-} mice. (A) Targeting strategy. The endogenous Gadd45g contains 4 exons. A fragment of Gadd45g including exons 1–3 was replaced with a PMG-neo cassette. A XbaI site introduced in the PMG-neo and one genomic XbaI site external to the targeting construct were used for determination of homologous recombination by Southern blot analysis, using a flanking probe (first line). (B) Southern blot analysis of target ES cells clones yielded a ~2.9 Kb hybridizing fragment corresponding to endogenous Gadd45g, whereas the disrupted allele was 3.7 Kb. (C) PCR genotyping of tail DNA from Gadd45g^{+/+}, Gadd45g^{+/-} and Gadd45g^{-/-} mice. To detect the wild type allele, we used the primers JS1 (5'-GCTGTGCTTTCCGGAAGTGTGTA-3') and JS2 (5'-CGGCA-GATTTGAGGC TGTGT-3'), which generated a 335 bp band. The deleted allele was detected using JS2 and JS4 (5'-

AGTTGCCAGCCATCTGTTGT-3'), which produced a 486 bp product. (TIF)

Figure S2 Lack of Gadd45a and Gadd45b expression in purified somatic supporting precursor cells. (A) Microarray quantification of relative Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression in wild type XX and XY embryonic gonads (including mesonephros) from the time of the bipotential gonad (GEO data set GSE6916). (B) Microarray quantification of relative Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression in purified somatic supporting precursor cells during the critical sex determination period (10.5–11.5 dpc) (GEO data set GDS1724). (TIFF)

Acknowledgments

We thank V Cano for technical support, B Pintado for technical advice, E Samper for performing the FISH chromosome painting, and C Mark for editorial assistance. LGS receives a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) JAE Programme (CSIC).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HJ LG JS. Performed the experiments: HJ LG. Analyzed the data: HJ LG JS MT. Contributed reagents/materials/analysis tools: LC JF. Wrote the paper: HJ JS.

References

- Azam N, Vairapandi M, Zhang W, Hoffman B, Liebermann DA (2001) Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* 276: 2766–2774.
- Nakayama K, Hara T, Hibi M, Hirano T, Miyajima A (1999) A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. *J Biol Chem* 274: 24766–24772.
- Chung HK, Yi YW, Jung NC, Kim D, Suh JM, et al. (2003) CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. *J Biol Chem* 278: 28079–28088.
- Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA (2002) GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192: 327–338.
- Salvador JM, Mittelstadt PR, Belova GI, Fornace AJ Jr, Ashwell JD (2005) The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol* 6: 396–402.
- Takekawa M, Saito H (1998) A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95: 521–530.
- Liebermann DA, Hoffman B (2008) Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 3: 15.
- McLean CY, Reno PL, Pollen AA, Bassan AI, Capellini TD, et al. (2011) Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. *Nature* 471: 216–219.
- Kaufmann LT, Gierl MS, Niehrs C (2011) Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 11: 465–470.
- Kaufmann LT, Niehrs C (2011) Gadd45a and Gadd45g regulate neural development and exit from pluripotency in *Xenopus*. *Mech Dev* 128: 401–411.
- Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, et al. (2009) A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136: 129–138.
- Kashimada K, Koopman P (2010) Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 137: 3921–3930.
- Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, et al. (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 23: 176–184.
- Gupta M, Gupta SK, Balliet AG, Hollander MC, Fornace AJ, et al. (2005) Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* 24: 7170–7179.
- Cai Q, Dmitrieva NI, Ferraris JD, Michea LF, Salvador JM, et al. (2006) Effects of expression of p53 and Gadd45 on osmotic tolerance of renal inner medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F341–349.
- Li Y, Taketo T, Lau YF (2012) Isolation of fetal gonads from embryos of timed-pregnant mice for morphological and molecular studies. *Methods Mol Biol* 825: 3–16.
- Munger SC, Aylor DL, Syed HA, Magwene PM, Threadgill DW, et al. (2009) Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal. *Genes Dev* 23: 2521–2536.
- Cederroth CR, Pitetti JL, Papaioannou MD, Nef S (2007) Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endocrinol* 265–266: 3–9.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87: 1–28.
- Barriounevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, et al. (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 74: 195–201.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525–530.
- Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD (2005) Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod* 72: 492–501.
- Beverdam A, Koopman P (2006) Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Genet* 15: 417–431.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, et al. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426: 291–295.
- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, et al. (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627–4634.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, et al. (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17: 467–470.
- Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, et al. (2009) Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol* 7: e1000196.
- Gierl MS, Gruhn WH, von Seggern A, Maltry N, Niehrs C (2012) GADD45G Functions in Male Sex Determination by Promoting p38 Signaling and Sry Expression. *Dev Cell* 23: 1032–1042.
- Warr N, Carre GA, Siggers P, Falcato JV, Brixey R, et al. (2012) Gadd45gamma and Map3k4 Interactions Regulate Mouse Testis Determination via p38 MAPK-Mediated Control of Sry Expression. *Dev Cell* 23: 1020–1031.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA (2006) Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child* 91: 554–563.
- Blackless M, Charuvastra A, Derryck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K, et al. (2000) How sexually dimorphic are we? Review and synthesis. *Am J Hum Biol* 12: 151–166.
- De Kretser DM, Baker HW (1999) Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3443–3450.

Summary



Gadd45g function in the immune system and in sex determination

Introduction

Immune system

The growth arrest and DNA-damage induce 45 gene family (Gadd45) is composed of three members: *Gadd45a*, *Gadd45b* and *Gadd45g*. Each gene encodes for small (18 kDa), evolutionarily conserved proteins that share great similarity between them (55-57% overall identity at the amino acid level), highly acidic, and are localized both to the cell nucleus and cytoplasm (Zhang et al. 1999, Vairapandi et al. 2002). The Gadd45 genes are expressed in multiple mammalian tissues including heart, brain, spleen, lungs, liver, skeletal muscle, kidneys and testis. The Gadd45 family proteins are the classical proteins implicated in signalling: they are small, rapidly regulated both transcriptionally and post-transcriptionally and develop a variety of function mediating stress signalling and cell cycle regulation (reviewed in (Salvador et al. 2013)).

The Gadd45 gene expression is induced by different physiologic and environmental stresses including ionizing radiation, UV, mutagenic and chemotherapeutic agents (Liebermann et al. 1998, Gupta et al. 2005, Gupta et al. 2006, Gupta et al. 2006). In each case, the expression pattern is different, consistently with the different participation of each member in each stimulus.

In the immune system the Gadd45 family has an important role both in the innate and adaptive immunity. In the innate immunity it has been shown that *Gadd45a* and *Gadd45b* are expressed in granulocytes and macrophages and its expression is needed for the differentiation of these cell types (Gupta et al. 2005). The function of these cells is also affected by the *Gadd45a* and *Gadd45b* expression as shown by the lack of recruitment of macrophages to the peritoneal cavity after LPS injection in null mice, also these macrophages produce less cytokine and less reactive oxygen species (ROS) (Salerno et al. 2012).

In the adaptive immunity, the Gadd45 family has been mainly studied in T cells. But it is also relevant in B cells, NKTs and dendritic cells. For example, bone marrow dendritic cells express the three members of the Gadd45 family and dendritic cells deficient in *Gadd45a* show less activation of the MKK3/6-p38 classical pathway and produce less Th1 type cytokines such as IFN γ (Jirmanova et al. 2007). *Gadd45b* and *Gadd45g* have been related to the Th1 differentiation and function (Lu et al. 2001) (Yang et al. 2001). The mechanism involved in these alterations has been related to the alteration in the MAPKs signalling, mainly in the p38 and JNK activation by the MEKK4 which activation depends on the interaction with the Gadd45 proteins (Chi et al. 2004). Cells deficient in *Gadd45a* have a constitutive activation of p38, which causes an exacerbated activation of the cells leading the mice to develop an autoimmune disease, characterized by the presence of auto-antibodies, glomerulonephritis and proteinuria. This is caused because GADD45A is needed to block the activation of p38 by phosphorylation of the tyrosine 323 by ZAP70 after TCR activation (Salvador et al. 2005).

Particularly, *Gadd45g* was identified as an immediate early response gene in T lymphocytes (Beadling et al. 1993). In the immune system, *Gadd45g* is involved in Th1 function (Lu et al. 2001), but there is some discrepancy in the function of *Gadd45g* in T cell function. For example, in another study, in which T cell deficient in *Gadd45g* were cultivated with IL-2, there were no effects in proliferation, cell death or MAPKs activation (Hoffmeyer et al. 2001). It seems that the function of *Gadd45g* depends on the cell type and tissue in which is expressed. Recently, *Gadd45g* has been related to differentiation of hematopoietic cells (Thalheimer et al. 2014). This corroborates the tumour suppressor function of *Gadd45g*, and its silencing in many tumour types (Zhang et al. 2002, Ying et al. 2005, Flores et al. 2010, Zhang et al. 2010). Also, *Gadd45g* is critical in the adaptive response to tumours (Ju et al. 2009).

Taking all these into account, we think that is important to improve in the knowledge of *Gadd45g*'s role in the immune system and in tumour suppression.

Embryo development

In the development of a mammalian embryo there is an organ that undergoes an especial differentiation. The gonad is the only organ which can give rise to two completely different organs: an ovary or a testis.

In the beginning, the gonad appears around 10.5 dpc as an undifferentiated tissue in the surface of the mesonephros and it is the same in male and female embryos. It is composed of bipotencial cells that can follow either the male or female pathway (Karl et al. 1995) (Karl et al. 1995).

The expression of the *Sry* is the first indication of the testis differentiation. The expression of *Sry* begins around 11.5 dpc in a wave pattern from the centre to the poles of the gonad (Koopman et al. 1990). It is only expressed in somatic cells, not in germinal cells (Rossi et al. 1993). *Sry* induces *Sox9*, and *Sox9* directs the differentiation of the precursor cells into Sertoli cells, which are the main directors of the testis development (Wilhelm et al. 2005). There is also a paracrine signalling that induces Sertoli differentiation that ensures that the male pathway develops. Next, Sertoli cells are surrounded by peritubular myoid cells and endothelial cells forming the testis cords, which surround the germinal cells. This isolates the germinal cells and creates the environment needed for sperm development (Hadley et al. 1985). Around 12.5 dpc, Sertoli cells produce AMH that inhibits the development of the Müllerian ducts (the precursor of the upper part of the vagina, the fallopian tubes and oviducts in female embryos). Other main male cell types are the Leydig cells. These cells produce male hormones which allow the masculinization of the embryo, the development of the Wolffian conducts (epididymis, deferent conducts and seminal vesicles), testicular descent, and brain and external genitals masculinization.

Both male and female sex determinations are active processes that require the expression and activation of specific genes (Nef et al. 2005). But these cascades are antagonistic and during a period of time they are in balance. The sex determination takes place when this equilibrium is broken and one of the cascades is reinforced (Kim et al. 2006) (Vainio et al. 1999). Many genes are players in sex determination and whenever they are disrupted there are alterations in sexual development. These alterations are called

disorders of sexual development (DSD). These disorders included a variety of phenotypes. Between them one of the most frequent is hypospadias which appear in 1 of 300 born males. DSDs are a pediatric concern due to the difficulties in its management and the consequences related such as cancer or infertility. Also, it is important to consider the problems associated with the physical and psychological development in DSDs patients, being a main concern to be handled by a multidisciplinary team.

Aims

The main aims of this thesis are analyse the function of *Gadd45g* in the immune system and in sex determination.

1. *Gadd45g* in the immune system
 - 1.1. Analysis of the immune system and pathology of *Gadd45g* deficient mice
 - 1.2. *Gadd45g* function in CD4 activation: proliferation and induced cell death.
 - 1.3. *Gadd45g*'s role in CD4 effector T cells: differentiation and cytokine production.
 - 1.4. *Gadd45g* implication in T cell development: thymic selection
2. *Gadd45g* in embryo development
 - 2.1. Analysis of the reproductive system's phenotype of adult mice deficient in *Gadd45g*.
 - 2.2. Study of the effect of the lack of *Gadd45g* in the mix 129/C57/BL/6 and pure C57/BL/6 strains.

Results

Immune System

The analysis of the *Gadd45g* null mice displays minor abnormalities in the immune system. *Gadd45g* null mice present thymus enlargement which can be probably due to alterations in thymic selection as reflected in the western blot of *in vitro* activated cells from the thymus. In this wb activation of p38 and JNK are impaired and it could lead to a failure in negative selection. At later time points, the thymus enlargement is reduced but there are some alterations in the thymic populations which still may reflect problems in the thymic selection.

Cytometric analysis of spleen and lymphatic nodes show small differences between null and wt mice. For example, there is reduced number of Treg cells in younger mice in comparison with wt.

Gadd45g is a positive regulator of proliferation. This was observed when *Gadd45g*^{-/-} and wt cells were cultivated under different mitogens and *Gadd45g*^{-/-} cells proliferate less, independently of the stimulus used.

In vitro differentiation of Th1, Th2 and Th17 of cell isolated from lymphatic nodes of *Gadd45g*^{-/-} and wt mice was done. Th1 cells from *Gadd45g*^{-/-} produced less IL-2 and MAPKs analysis by wb show less p38 and more JNK activation. In Th17 cells, *Gadd45g*^{-/-} produced more IL-17 but MAPKs analysis was not done. In Th2 cells, lack of *Gadd45g* is not relevant.

In summary, *Gadd45g* seems to be relevant for the differentiation and function of the cells of the immune system, and more research is needed to determine if the effects seen in the thymic selection may affect the immune response when challenged.

Embryo development

Gadd45g null mice suffer a sporadic male to female XY sex reversal. The analysis of the frequencies of male to female mice in the *Gadd45g*^{-/-} colonies resulted in the observation that the frequencies of male were very low in the 129J-C57BL/6 background with less than 10% of male mice, and 0% in the pure C57BL/6. Similar analysis was done with the *Gadd45a*^{-/-} and *Gadd45b*^{-/-}, but no defects were observed. Phenotypical and histological analysis of XY *Gadd45g*^{-/-} individuals show a range of sex reversion in the mix 129J-C57BL/6 background and a complete sex reversal phenotype in the pure C57BL/6, in which all XY *Gadd45g*^{-/-} developed as XY females. In both cases all XY mice were infertile. This was confirmed by PCR for the male marker Sry and by FISH of the sex chromosomes. The histological analysis of the adult gonads shows in the pure background perfectly formed ovaries which contained several follicles in different developmental stages. The fact that the phenotype was so intense leads us to the hypothesis that the alteration must be in the early moments of sex determination. We analysed the expression of *Gadd45g* in the critical window of sex

determination both by *in situ* hybridization with specifically probes and by Q-PCR. *Gadd45g* was expressed in a fashion similar to Sry and its expression was restricted to the gonadal tissue. However, the expression was identical in XY and XX gonads. We analysed the expression of early markers of testis development such as SOX9 and its direct target AMH by whole mount immunofluorescence of embryonic gonads at 11.5 and 12.5 dpc. Both markers were undetectable in XY gonads from *Gadd45g*^{-/-} embryos. With these results we decided to do a time course of the expression of Sry by Q-PCR in XY gonads from *Gadd45g*^{+/+}, *Gadd45g*^{+/-} and *Gadd45g*^{-/-}. This show that the Sry expression was blocked from the beginning in the *Gadd45g*^{-/-}. So, *Gadd45g* is necessary for the Sry expression, testis development and male fertility.

Conclusions

1. *Gadd45g* in the immune system
 - 1.1. The *Gadd45g* deficient mice do not develop any autoimmune or cancer disease.
 - 1.2. *Gadd45g* deficient mice develop timomegalia with alterations in the SP CD4 and DN populations due to defects in the MAPKs signalling during positive and negative selection with altered activation of p38 and JNK.
 - 1.3. *Gadd45g* is a positive regulator of proliferation.
 - 1.4. Th1 and Th17 cell function is impaired in the *Gadd45g* deficient mice as reflected in the low production of IL-2 and increased production of IL-17 compared with wt, respectively. In Th1 cell, there is less activation of p38 and increased activation of JNK.
2. *Gadd45g* is a key player in sex determination
 - 2.1. *Gadd45g* XY mice develop as sex reversed XY females in a pure C57BL/6 background.
 - 2.2. *Gadd45g* is expressed both in male and female gonads during the critical period of time of sex determination. Its expression resembles to the Sry expression and it is limited to the gonadal tissue and absent in the mesonephros.
 - 2.3. *Gadd45a* and *Gadd45b* are not expressed in the developing gonad.

2.4. *Gadd45g* is necessary for the male sex determination. *Gadd5g* induces Sry expression indirectly. Lack of *Gadd45g* blocks the Sry expression and in consequence the expression of its direct target, Sox9, and the male pathway, causing male to female sex reversal.

Nomenclatura

| Espece | Símbolo |
|--------|------------|
| Humano | <i>GEN</i> |
| | PROTEÍNA |
| Ratón | <i>Gen</i> |
| | PROTEÍNA |

Agradecimientos

Bibliografía

1. Abdollahi, A., K. A. Lord, B. Hoffman-Liebermann and D. A. Liebermann (1991). "Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines." *Oncogene* **6**(1): 165-167.
2. Allard, S., P. Adin, L. Gouedard, N. di Clemente, N. Josso, M. C. Orgebin-Crist, J. Y. Picard and F. Xavier (2000). "Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin." *Development* **127**(15): 3349-3360.
3. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." *The Journal of experimental medicine* **204**(8): 1849-1861.
4. Appleman, L. J. and V. A. Boussiotis (2003). "T cell anergy and costimulation." *Immunol Rev* **192**: 161-180.
5. Arango, N. A., R. Lovell-Badge and R. R. Behringer (1999). "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development." *Cell* **99**(4): 409-419.
6. Arend, W. P., G. Palmer and C. Gabay (2008). "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines." *Immunol Rev* **223**: 20-38.
7. Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel and S. Tonegawa (1994). "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus." *Cell* **76**(4): 651-663.
8. Azam, N., M. Vairapandi, W. Zhang, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2001). "Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control." *J Biol Chem* **276**(4): 2766-2774.
9. Bagheri-Fam, S., H. Sim, P. Bernard, I. Jayakody, M. M. Taketo, G. Scherer and V. R. Harley (2008). "Loss of *Fgfr2* leads to partial XY sex reversal." *Dev Biol* **314**(1): 71-83.
10. Barbaux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grunfeld, F. Jaubert, F. Kuttann, C. N. Fekete, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous and K. McElreavey (1997). "Donor splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome." *Nat Genet* **17**(4): 467-470.
11. Barrionuevo, F., S. Bagheri-Fam, J. Klattig, R. Kist, M. M. Taketo, C. Englert and G. Scherer (2006). "Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice." *Biol Reprod* **74**(1): 195-201.
12. Barrionuevo, F. and G. Scherer (2010). "SOX E genes: *SOX9* and *SOX8* in mammalian testis development." *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**(3): 433-436.
13. Beadling, C., K. W. Johnson and K. A. Smith (1993). "Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(7): 2719-2723.
14. Behringer, R. R., M. J. Finegold and R. L. Cate (1994). "Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development." *Cell* **79**(3): 415-425.
15. Bettelli, E., T. Korn and V. K. Kuchroo (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* **19**(6): 652-657.
16. Beukeboom, L. W. (2012). "Microbial manipulation of host sex determination. Endosymbiotic bacteria can directly manipulate their host's sex determination towards the production of female offspring." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**(6): 484-488.
17. Biason-Lauber, A. (2010). "Control of sex development." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **24**(2): 163-186.
18. Biason-Lauber, A., D. Konrad, F. Navratil and E. J. Schoenle (2004). "A *WNT4* mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman." *N Engl J Med* **351**(8): 792-798.

19. Bogani, D., P. Siggers, R. Brixey, N. Warr, S. Beddow, J. Edwards, D. Williams, D. Wilhelm, P. Koopman, R. A. Flavell, H. Chi, H. Ostrer, S. Wells, M. Cheeseman and A. Greenfield (2009). "Loss of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 (MAP3K4) Reveals a Requirement for MAPK Signalling in Mouse Sex Determination." *PLoS Biology* **7**(9): e1000196.
20. Borum, K. (1967). "Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova." *Exp Cell Res* **45**(1): 39-47.
21. Bouma, G. J., K. H. Albrecht, L. L. Washburn, A. K. Recknagel, G. A. Churchill and E. M. Eicher (2005). "Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells." *Development* **132**(13): 3045-3054.
22. Bradford, S. T., R. Hiramatsu, M. P. Maddugoda, P. Bernard, M. C. Chaboissier, A. Sinclair, A. Schedl, V. Harley, Y. Kanai, P. Koopman and D. Wilhelm (2009). "The Cerebellin 4 Precursor Gene Is a Direct Target of SRY and SOX9 in Mice." *Biology of Reproduction* **80**(6): 1178-1188.
23. Bradford, S. T., D. Wilhelm, R. Bandiera, V. Vidal, A. Schedl and P. Koopman (2009). "A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo." *Hum Mol Genet* **18**(18): 3429-3438.
24. Brennan, J. and B. Capel (2004). "One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development." *Nature reviews. Genetics* **5**(7): 509-521.
25. Brennan, J., J. Karl and B. Capel (2002). "Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad." *Dev Biol* **244**(2): 418-428.
26. Bridges, C. B. (1925). "Sex in Relation to Chromosomes and Genes." *The American Naturalist* **59**(661): 127-137.
27. Bullejos, M. and P. Koopman (2001). "Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges." *Dev Dyn* **221**(2): 201-205.
28. Bullejos, M. and P. Koopman (2005). "Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal." *Dev Biol* **278**(2): 473-481.
29. Candal, E., V. Thermes, J. S. Joly and F. Bourrat (2004). "Medaka as a model system for the characterisation of cell cycle regulators: a functional analysis of Ol-Gadd45gamma during early embryogenesis." *Mech Dev* **121**(7-8): 945-958.
30. Capel, B., K. H. Albrecht, L. L. Washburn and E. M. Eicher (1999). "Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry." *Mech Dev* **84**(1-2): 127-131.
31. Carpenter, A. C. and R. Bosselut (2010). "Decision checkpoints in the thymus." *Nature Immunology* **11**(8): 666-673.
32. Colvin, J. S., R. P. Green, J. Schmahl, B. Capel and D. M. Ornitz (2001). "Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9." *Cell* **104**(6): 875-889.
33. Crisponi, L., M. Deiana, A. Loi, F. Chiappe, M. Uda, P. Amati, L. Bisceglia, L. Zelante, R. Nagaraja, S. Porcu, M. S. Ristaldi, R. Marzella, M. Rocchi, M. Nicolino, A. Lienhardt-Roussie, A. Nivelon, A. Verloes, D. Schlessinger, P. Gasparini, D. Bonneau, A. Cao and G. Pilia (2001). "The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome." *Nat Genet* **27**(2): 159-166.
34. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *The Journal of experimental medicine* **198**(12): 1875-1886.
35. Chi, H., B. Lu, M. Takekawa, R. J. Davis and R. A. Flavell (2004). "GADD45beta/GADD45gamma and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFNgamma production in T cells." *EMBO J* **23**(7): 1576-1586.
36. Chung, H. K., Y. W. Yi, N. C. Jung, D. Kim, J. M. Suh, H. Kim, K. C. Park, D. W. Kim, E. S. Hwang, J. H. Song, B. J. Ku, H. J. Han, H. K. Ro, J. M. Kim and M. Shong (2003). "Gadd45gamma expression is reduced in anaplastic thyroid cancer and its reexpression results in apoptosis." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8): 3913-3920.
37. da Silva, A. L., M. Even, M. Grynberg, V. Gallot, R. Frydman and R. Fanchin (2010). "[Anti-Mullerian hormone: player and marker of folliculogenesis]." *Gynecologie, obstetrique & fertilite* **38**(7-8): 471-474.
38. de la Calle-Mustienes, E., A. Glavic, J. Modolell and J. L. Gomez-Skarmeta (2002). "Xiro homeoproteins coordinate cell cycle exit and primary neuron formation by upregulating neuronal-fate repressors and downregulating the cell-cycle inhibitor XGadd45-gamma." *Mech Dev* **119**(1): 69-80.
39. De Santa Barbara, P., N. Bonneaud, B. Boizet, M. Desclozeaux, B. Moniot, P. Sudbeck, G. Scherer, F. Poulat and P. Berta (1998). "Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic

factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene." *Mol Cell Biol* **18**(11): 6653-6665.

40. de Santa Barbara, P., C. Mejean, B. Moniot, M. H. Malcles, P. Berta and B. Boizet-Bonhoure (2001). "Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression." *Biol Reprod* **64**(3): 775-783.

41. DeFalco, T. and B. Capel (2009). "Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**(1): 457-482.

42. Del Prete, G. (1992). "Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy." *Allergy* **47**(5): 450-455.

43. Dengke K. Ma, J. U. G., Guo-li Ming, and Hongjun Song (2009). "DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation." *Cell Cycle*.

44. di Clemente, N., C. Wilson, E. Faure, L. Boussin, P. Carmillo, R. Tizard, J. Y. Picard, B. Vigier, N. Josso and R. Cate (1994). "Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone." *Mol Endocrinol* **8**(8): 1006-1020.

45. DiNapoli, L. and B. Capel (2008). "SRY and the standoff in sex determination." *Mol Endocrinol* **22**(1): 1-9.

46. Dutton, R. W., L. M. Bradley and S. L. Swain (1998). "T cell memory." *Annu Rev Immunol* **16**: 201-223.

47. Eggers, S. and A. Sinclair (2012). "Mammalian sex determination-insights from humans and mice." *Chromosome Res* **20**(1): 215-238.

48. Eicher, E. M., E. P. Shown and L. L. Washburn (1995). "Sex reversal in C57BL/6J-YPOS mice corrected by a Sry transgene." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**(1333): 263-268; discussion 268-269.

49. Eicher, E. M., L. L. Washburn, J. B. Whitney, 3rd and K. E. Morrow (1982). "Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal." *Science* **217**(4559): 535-537.

50. Eichmann, K. (1995). "A signal strength hypothesis of thymic selection: preliminary considerations." *Immunology letters* **44**(2-3): 87-90.

51. Fan, W., G. Richter, A. Cereseto, C. Beadling and K. A. Smith (1999). "Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest." *Oncogene* **18**(47): 6573-6582.

52. Felici, M. D., A. D. Carlo, M. Pesce, S. Iona, M. G. Farrace and M. Piacentini (1999). "Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo." *Cell Death Differ* **6**(9): 908-915.

53. Flores, O. and K. L. Burnstein (2010). "GADD45gamma: a new vitamin D-regulated gene that is antiproliferative in prostate cancer cells." *Endocrinology* **151**(10): 4654-4664.

54. Ford, C. E., E. P. Evans and R. L. Gardner (1975). "Marker chromosome analysis of two mouse chimaeras." *J Embryol Exp Morphol* **33**(2): 447-457.

55. Ford, C. E., K. W. Jones, P. E. Polani, J. C. De Almeida and J. H. Briggs (1959). "A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)." *Lancet* **1**(7075): 711-713.

56. Fornace, A. J., Jr., D. W. Nebert, M. C. Hollander, J. D. Luethy, M. Papathanasiou, J. Fargnoli and N. J. Holbrook (1989). "Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents." *Molecular and Cellular Biology* **9**(10): 4196-4203.

57. Foster, J. W., M. A. Dominguez-Steglich, S. Guoli, C. Kwok, P. A. Weller, M. Stevanovic, J. Weissenbach, S. Mansour, I. D. Young, P. N. Goodfellow and et al. (1994). "Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene." *Nature* **372**(6506): 525-530.

58. Gattinoni, L., C. A. Klebanoff, D. C. Palmer, C. Wrzesinski, K. Kerstann, Z. Yu, S. E. Finkelstein, M. R. Theoret, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo (2005). "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells." *J Clin Invest* **115**(6): 1616-1626.

59. Gazel, A., R. I. Nijhawan, R. Walsh and M. Blumenberg (2008). "Transcriptional profiling defines the roles of ERK and p38 kinases in epidermal keratinocytes." *J Cell Physiol* **215**(2): 292-308.

60. Gierl, M. S., W. H. Gruhn, A. von Seggern, N. Maltry and C. Niehrs (2012). "GADD45G functions in male sex determination by promoting p38 signaling and Sry expression." *Developmental cell* **23**(5): 1032-1042.

61. Gilbert, S. F. (2000). "Developmental Biology". M. S. A. Sunderland, c2000.

62. Gondos, B., A. Rao and J. Ramachandran (1980). "Effects of antiserum to luteinizing hormone on the structure and function of rat Leydig cells." *J Endocrinol* **87**(2): 265-270.

63. Green, D. R., N. Droin and M. Pinkoski (2003). "Activation-induced cell death in T cells." *Immunol Rev* **193**: 70-81.
64. Guaragna, M. S., F. C. Soardi, J. G. Assumpcao, J. Zambaldi Lde, I. A. Cardinalli, J. A. Yunes, M. P. de Mello, S. R. Brandalise and S. Aguiar Sdos (2010). "The novel WT1 gene mutation p.H377N associated to Denys-Drash syndrome." *J Pediatr Hematol Oncol* **32**(6): 486-488.
65. Gubbay, J., P. Koopman, J. Collignon, P. Burgoyne and R. Lovell-Badge (1990). "Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy." *Development* **109**(3): 647-653.
66. Guellaen, G., M. Casanova, C. Bishop, D. Geldwerth, G. Andre, M. Fellous and J. Weissenbach (1984). "Human XX males with Y single-copy DNA fragments." *Nature* **307**(5947): 172-173.
67. Guo, J. K., A. Hammes, M. C. Chaboissier, V. Vidal, Y. Xing, F. Wong and A. Schedl (2002). "Early gonadal development: exploring Wt1 and Sox9 function." *Novartis Found Symp* **244**: 23-31; discussion 31-42, 253-257.
68. Gupta, M., S. K. Gupta, A. G. Balliet, M. C. Hollander, A. J. Fornace, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2005). "Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis." *Oncogene* **24**(48): 7170-7179.
69. Gupta, M., S. K. Gupta, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2006). "Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition." *J Biol Chem* **281**(26): 17552-17558.
70. Gupta, S. K., M. Gupta, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2006). "Hematopoietic cells from gadd45a-deficient and gadd45b-deficient mice exhibit impaired stress responses to acute stimulation with cytokines, myeloablation and inflammation." *Oncogene* **25**(40): 5537-5546.
71. Hacker, A., B. Capel, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge (1995). "Expression of Sry, the mouse sex determining gene." *Development* **121**(6): 1603-1614.
72. Hadley, M. A., S. W. Byers, C. A. Suarez-Quian, H. K. Kleinman and M. Dym (1985). "Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro." *The Journal of cell biology* **101**(4): 1511-1522.
73. Hanley, N. A., D. M. Hagan, M. Clement-Jones, S. G. Ball, T. Strachan, L. Salas-Cortes, K. McElreavey, S. Lindsay, S. Robson, P. Bullen, H. Ostrer and D. I. Wilson (2000). "SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development." *Mech Dev* **91**(1-2): 403-407.
74. Harada, M., K. Seino, H. Wakao, S. Sakata, Y. Ishizuka, T. Ito, S. Kojo, T. Nakayama and M. Taniguchi (2004). "Down-regulation of the invariant Valpha14 antigen receptor in NKT cells upon activation." *Int Immunol* **16**(2): 241-247.
75. Hardy, M. P., S. J. Gelber, Z. F. Zhou, T. M. Penning, J. W. Ricigliano, V. K. Ganjam, D. Nonneman and L. L. Ewing (1991). "Hormonal control of Leydig cell differentiation." *Ann N Y Acad Sci* **637**: 152-163.
76. Harley, V. R., D. I. Jackson, P. J. Hextall, J. R. Hawkins, G. D. Berkovitz, S. Sockanathan, R. Lovell-Badge and P. N. Goodfellow (1992). "DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females." *Science* **255**(5043): 453-456.
77. Hildesheim, J., D. V. Bulavin, M. R. Anver, W. G. Alvord, M. C. Hollander, L. Vardanian and A. J. Fornace, Jr. (2002). "Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53." *Cancer research* **62**(24): 7305-7315.
78. Hilscher, B., W. Hilscher, B. Bulthoff-Ohnolz, U. Kramer, A. Birke, H. Pelzer and G. Gauss (1974). "Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis." *Cell Tissue Res* **154**(4): 443-470.
79. Hiramatsu, R., S. Matoba, M. Kanai-Azuma, N. Tsunekawa, Y. Katoh-Fukui, M. Kurohmaru, K. i. Morohashi, D. Wilhelm, P. Koopman and Y. Kanai (2009). "A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice." *Development* **136**(1): 129-138.
80. Hoffman, B. and D. A. Liebermann (2007). "Role of gadd45 in myeloid cells in response to hematopoietic stress." *Blood Cells Mol Dis* **39**(3): 344-347.
81. Hoffmeyer, A., R. Piekorz, R. Moriggl and J. N. Ihle (2001). "Gadd45gamma is dispensable for normal mouse development and T-cell proliferation." *Molecular and Cellular Biology* **21**(9): 3137-3143.
82. Hollander, M. C., M. S. Sheikh, D. V. Bulavin, K. Lundgren, L. Augeri-Henmueller, R. Shehee, T. A. Molinaro, K. E. Kim, E. Tolosa, J. D. Ashwell, M. P. Rosenberg, Q. Zhan, P. M. Fernandez-Salguero, W. F. Morgan, C. X. Deng and A. J. Fornace, Jr. (1999). "Genomic instability in Gadd45a-deficient mice." *Nature Genetics* **23**(2): 176-184.

83. Hossain, A. and G. F. Saunders (2001). "The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1." *J Biol Chem* **276**(20): 16817-16823.
84. Huang, H. S., G. M. Kubish, T. M. Redmond, D. L. Turner, R. C. Thompson, G. G. Murphy and M. D. Uhler (2010). "Direct transcriptional induction of Gadd45gamma by Ascl1 during neuronal differentiation." *Mol Cell Neurosci* **44**(3): 282-296.
85. Hughes, I. A., C. Houk, S. F. Ahmed and P. A. Lee (2006). "Consensus statement on management of intersex disorders." *J Pediatr Urol* **2**(3): 148-162.
86. Imbeaud, S., D. Carre-Eusebe, R. Rey, C. Belville, N. Josso and J. Y. Picard (1994). "Molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome: a study of 19 families." *Hum Mol Genet* **3**(1): 125-131.
87. Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* **5**(10): 987-995.
88. J.-F. Baroillera, Y. G., and A. Fostierb (1999). "Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish." *Cellular and molecular life sciences* **55**.
89. Jacobs, P. A. and J. A. Strong (1959). "A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism." *Nature* **183**(4657): 302-303.
90. Jakob, S. and R. Lovell-Badge (2011). "Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals." *FEBS Journal* **278**(7): 1002-1009.
91. Jiang, S. and C. Dong (2013). "A complex issue on CD4(+) T-cell subsets." *Immunol Rev* **252**(1): 5-11.
92. Jirmanova, L., M. L. Giardino Torchia, N. D. Sarma, P. R. Mittelstadt and J. D. Ashwell (2011). "Lack of the T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation." *Blood* **118**(12): 3280-3289.
93. Jirmanova, L., D. Jankovic, A. J. Fornace, Jr. and J. D. Ashwell (2007). "Gadd45alpha regulates p38-dependent dendritic cell cytokine production and Th1 differentiation." *J Immunol* **178**(7): 4153-4158.
94. Johnen, H., L. Gonzalez-Silva, L. Carramolino, J. M. Flores, M. Torres and J. M. Salvador (2013). "Gadd45g is essential for primary sex determination, male fertility and testis development." *PLoS One* **8**(3): e58751.
95. Jordan, B. K., J. H. Shen, R. Olaso, H. A. Ingraham and E. Vilain (2003). "Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10866-10871.
96. Ju, S., Y. Zhu, L. Liu, S. Dai, C. Li, E. Chen, Y. He, X. Zhang and B. Lu (2009). "Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses." *Eur J Immunol* **39**(11): 3010-3018.
97. Karl, J. and B. Capel (1995). "Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**(1333): 235-242.
98. Kashimada, K. and P. Koopman (2010). "Sry: the master switch in mammalian sex determination." *Development* **137**(23): 3921-3930.
99. Katoh-Fukui, Y., K. Miyabayashi, T. Komatsu, A. Owaki, T. Baba, Y. Shima, T. Kidokoro, Y. Kanai, A. Schedl, D. Wilhelm, P. Koopman, Y. Okuno and K. i. Morohashi (2011). "Cbx2, a Polycomb Group Gene, Is Required for Sry Gene Expression in Mice." *Endocrinology* **153**(2): 913-924.
100. Katoh-Fukui, Y., R. Tsuchiya, T. Shiroishi, Y. Nakahara, N. Hashimoto, K. Noguchi and T. Higashinakagawa (1998). "Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice." *Nature* **393**(6686): 688-692.
101. Kaufmann, L. T., M. S. Gierl and C. Niehrs (2011). "Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development." *Gene Expression Patterns* **11**(8): 465-470.
102. Kaufmann, L. T. and C. Niehrs (2011). "Gadd45a and Gadd45g regulate neural development and exit from pluripotency in Xenopus." *Mech Dev* **128**(7-10): 401-411.
103. Kaur, G., A. Delluc-Clavieres, I. K. Poon, J. K. Forwood, D. J. Glover and D. A. Jans (2010). "Calmodulin-dependent nuclear import of HMG-box family nuclear factors: importance of the role of SRY in sex reversal." *Biochem J* **430**(1): 39-48.
104. Kawahara, A., Y. S. Che, R. Hanaoka, H. Takeda and I. B. Dawid (2005). "Zebrafish GADD45beta genes are involved in somite segmentation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 361-366.
105. Kent, A., E. Simpson, D. Ellwood and M. Silink (2004). "46,XY sex-reversal (Swyer syndrome) and congenital diaphragmatic hernia." *Am J Med Genet A* **131**(1): 103-105.

106. Kim, Y., N. Bingham, R. Sekido, K. L. Parker, R. Lovell-Badge and B. Capel (2007). "Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16558-16563.
107. Kim, Y., A. Kobayashi, R. Sekido, L. DiNapoli, J. Brennan, M. C. Chaboissier, F. Poulat, R. R. Behringer, R. Lovell-Badge and B. Capel (2006). "Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination." *PLoS Biol* **4**(6): e187.
108. Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger and B. Kyewski (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." *Nature reviews. Immunology* **9**(12): 833-844.
109. Kojima, S., K. Mayumi-Matsuda, H. Suzuki and T. Sakata (1999). "Molecular cloning of rat GADD45gamma, gene induction and its role during neuronal cell death." *FEBS letters* **446**(2-3): 313-317.
110. Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge (1991). "Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry." *Nature* **351**(6322): 117-121.
111. Koopman, P., A. Munsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge (1990). "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation." *Nature* **348**(6300): 450-452.
112. Kovalsky, O., F. D. Lung, P. P. Roller and A. J. Fornace, Jr. (2001). "Oligomerization of human Gadd45a protein." *J Biol Chem* **276**(42): 39330-39339.
113. Leitch, H. G., W. W. Tang and M. A. Surani (2013). "Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals." *Curr Top Dev Biol* **104**: 149-187.
114. Li, Y., T. Taketo and Y. F. Lau (2012). "Isolation of fetal gonads from embryos of timed-pregnant mice for morphological and molecular studies." *Methods Mol Biol* **825**: 3-16.
115. Liblau, R. S., S. M. Singer and H. O. McDevitt (1995). "Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases." *Immunol Today* **16**(1): 34-38.
116. Liebermann, D. A. and B. Hoffman (1998). "MyD genes in negative growth control." *Oncogene* **17**(25): 3319-3329.
117. Liebermann, D. A. and B. Hoffman (2007). "Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress." *Blood Cells Mol Dis* **39**(3): 329-335.
118. Liebermann, D. A. and B. Hoffman (2008). "Gadd45 in stress signaling." *J Mol Signal* **3**: 15.
119. Liu, L., E. Tran, Y. Zhao, Y. Huang, R. Flavell and B. Lu (2005). "Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity." *The Journal of experimental medicine* **202**(10): 1341-1347.
120. Lizotte, A., I. Quessy, M. C. Vanier, J. Martineau, S. Caron, M. Darveau, A. Dube, E. Gilbert, N. Blais and L. Lalonde (2002). "Reliability, validity and ease of use of a portable point-of-care coagulation device in a pharmacist-managed anticoagulation clinic." *J Thromb Thrombolysis* **14**(3): 247-254.
121. Lu, B., A. F. Ferrandino and R. A. Flavell (2004). "Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells." *Nat Immunol* **5**(1): 38-44.
122. Lu, B., H. Yu, C. Chow, B. Li, W. Zheng, R. J. Davis and R. A. Flavell (2001). "GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells." *Immunity* **14**(5): 583-590.
123. Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma and B. Xia (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." *Clin Dev Immunol* **2012**: 925135.
124. Luo, X., Y. Ikeda, D. A. Schlosser and K. L. Parker (1995). "Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene." *Mol Endocrinol* **9**(9): 1233-1239.
125. Luo, Y., D. L. Boyle, D. Hammaker, M. Edgar, G. Franzoso and G. S. Firestein (2011). "Suppression of collagen-induced arthritis in growth arrest and DNA damage-inducible protein 45beta-deficient mice." *Arthritis Rheum* **63**(10): 2949-2955.
126. M. Christine Hollander, M. S. S., Dmitry V. Bulavin1 Karen Lundgren, Laura Augeri-Henmueller, Ronald Shehee, Thomas A. Molinaro, Kate E. Kim, Eva Tolosa, Jonathan D. Ashwell, Michael P. Rosenberg, Qimin Zhan, Pedro M. Fernández-Salguero, and C.-X. D. A. J. F. J. William F.Morgan (1999). "Genomic instability in Gadd45a-deficient mice." *Nat Genet*.
127. Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-479.
128. Marsden, V. S. and A. Strasser (2003). "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more." *Annu Rev Immunol* **21**: 71-105.
129. Martín Campagne, E., J. Guerrero Fernández, R. Gracia Bouthelie and J. A. Tovar Larrucea (2006). "Asociación entre síndrome de WAGR y hernia diafragmática." *Anales de Pediatría* **65**(6): 616-618.

130. Matson, C. K., M. W. Murphy, A. L. Sarver, M. D. Griswold, V. J. Bardwell and D. Zarkower (2011). "DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis." *Nature* **476**(7358): 101-104.
131. McElreavey, K., E. Vilain, N. Abbas, I. Herskowitz and M. Fellous (1993). "A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3368-3372.
132. McLaren, A., E. Simpson, K. Tomonari, P. Chandler and H. Hogg (1984). "Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen." *Nature* **312**(5994): 552-555.
133. McLean, C. Y., P. L. Reno, A. A. Pollen, A. I. Bassan, T. D. Capellini, C. Guenther, V. B. Indjeian, X. Lim, D. B. Menke, B. T. Schaar, A. M. Wenger, G. Bejerano and D. M. Kingsley (2011). "Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits." *Nature* **471**(7337): 216-219.
134. Meeks, J. J., J. Weiss and J. L. Jameson (2003). "Dax1 is required for testis determination." *Nat Genet* **34**(1): 32-33.
135. Miosge, L. A. and C. C. Goodnow (2005). "Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis." *Immunol Cell Biol* **83**(4): 318-335.
136. Mita, H., J. Tsutsui, M. Takekawa, E. A. Witten and H. Saito (2002). "Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding." *Molecular and Cellular Biology* **22**(13): 4544-4555.
137. Miyake, Z., M. Takekawa, Q. Ge and H. Saito (2007). "Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain." *Molecular and Cellular Biology* **27**(7): 2765-2776.
138. Moniot, B., F. Declosmenil, F. Barrionuevo, G. Scherer, K. Aritake, S. Malki, L. Marzi, A. Cohen-Solal, I. Georg, J. Klattig, C. Englert, Y. Kim, B. Capel, N. Eguchi, Y. Urade, B. Boizet-Bonhoure and F. Poulat (2009). "The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation." *Development* **136**(11): 1813-1821.
139. Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, L. Rose and A. H. Reddi (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(2): 155-174.
140. Munday, P. L., J. Wilson White and R. R. Warner (2006). "A social basis for the development of primary males in a sex-changing fish." *Proc Biol Sci* **273**(1603): 2845-2851.
141. Munger, S. C., D. L. Aylor, H. A. Syed, P. M. Magwene, D. W. Threadgill and B. Capel (2009). "Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal." *Genes Dev* **23**(21): 2521-2536.
142. Munsterberg, A. and R. Lovell-Badge (1991). "Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation." *Development* **113**(2): 613-624.
143. Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nature reviews. Immunology* **2**(12): 933-944.
144. Nagamine, C. M., K. Morohashi, C. Carlisle and D. K. Chang (1999). "Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene *Sry*." *Dev Biol* **216**(1): 182-194.
145. Nakayama, K., T. Hara, M. Hibi, T. Hirano and A. Miyajima (1999). "A novel oncostatin M-inducible gene *OIG37* forms a gene family with *MyD118* and *GADD45* and negatively regulates cell growth." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **274**(35): 24766-24772.
146. Nef, S., O. Schaad, N. R. Stallings, C. R. Cederroth, J. L. Pitetti, G. Schaer, S. Malki, M. Dubois-Dauphin, B. Boizet-Bonhoure, P. Descombes, K. L. Parker and J. D. Vassalli (2005). "Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development." *Dev Biol* **287**(2): 361-377.
147. Nef, S., S. Verma-Kurvari, J. Merenmies, J. D. Vassalli, A. Efstratiadis, D. Accili and L. F. Parada (2003). "Testis determination requires insulin receptor family function in mice." *Nature* **426**(6964): 291-295.
148. Niehrs, C. and A. Schafer (2012). "Active DNA demethylation by *Gadd45* and DNA repair." *Trends in cell biology* **22**(4): 220-227.
149. Palmer, M. S., A. H. Sinclair, P. Berta, N. A. Ellis, P. N. Goodfellow, N. E. Abbas and M. Fellous (1989). "Genetic evidence that *ZFY* is not the testis-determining factor." *Nature* **342**(6252): 937-939.
150. Palmer, S. J. and P. S. Burgoyne (1991). "In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX----XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY." *Development* **112**(1): 265-268.

151. Papa, S., F. Zazzeroni, Y. X. Fu, C. Bubici, K. Alvarez, K. Dean, P. A. Christiansen, R. A. Anders and G. Franzoso (2008). "Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling." *J Clin Invest* **118**(5): 1911-1923.
152. Passerini, L., S. Di Nunzio, S. Gregori, E. Gambineri, M. Cecconi, M. G. Seidel, G. Cazzola, L. Perroni, A. Tommasini, S. Vignola, L. Guidi, M. G. Roncarolo and R. Bacchetta (2011). "Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome." *Eur J Immunol* **41**(4): 1120-1131.
153. Pepling, M. E. and A. C. Spradling (1998). "Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts." *Development* **125**(17): 3323-3328.
154. Pitetti, J. L., P. Calvel, Y. Romero, B. Conne, V. Truong, M. D. Papaioannou, O. Schaad, M. Docquier, P. L. Herrera, D. Wilhelm and S. Nef (2013). "Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice." *PLoS Genet* **9**(1): e1003160.
155. Polanco, J. C., D. Wilhelm, T. L. Davidson, D. Knight and P. Koopman (2010). "Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development." *Hum Mol Genet* **19**(3): 506-516.
156. Pontiggia, A., R. Rimini, V. R. Harley, P. N. Goodfellow, R. Lovell-Badge and M. E. Bianchi (1994). "Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes." *EMBO J* **13**(24): 6115-6124.
157. Porter, F. D. (2008). "Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management." *Eur J Hum Genet* **16**(5): 535-541.
158. Qi Cai, N. I. D., Joan D. Ferraris, Luis F. Michea, Jesus M. Salvador, M. Christine Hollander, Albert J. Fornace, Jr., Robert A. Fenton and Maurice B. Burg (2006). "Effects of expression of p53 and Gadd45 on osmotic tolerance of renal inner medullary cells."
159. Rai, K., I. J. Huggins, S. R. James, A. R. Karpf, D. A. Jones and B. R. Cairns (2008). "DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45." *Cell* **135**(7): 1201-1212.
160. Rincon, M. (1998). "Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway." *EMBO J* **17**(10): 2817-2829.
161. Rincon, M., A. Whitmarsh, D. D. Yang, L. Weiss, B. Derijard, P. Jayaraj, R. J. Davis and R. A. Flavell (1998). "The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes." *The Journal of experimental medicine* **188**(10): 1817-1830.
162. Robert, N. M., J. J. Tremblay and R. S. Viger (2002). "Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters." *Endocrinology* **143**(10): 3963-3973.
163. Roberts, L. M., Y. Hirokawa, M. W. Nachtigal and H. A. Ingraham (1999). "Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development." *Dev Biol* **208**(1): 110-122.
164. Romagnani, S. (2006). "Regulation of the T cell response." *Clin Exp Allergy* **36**(11): 1357-1366.
165. Ross, D. G., J. Bowles, P. Koopman and S. Lehnert (2008). "New insights into SRY regulation through identification of 5' conserved sequences." *BMC Mol Biol* **9**: 85.
166. Rossi, P., S. Dolci, C. Albanesi, P. Grimaldi and R. Geremia (1993). "Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis." *Mol Reprod Dev* **34**(4): 369-373.
167. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
168. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* **133**(5): 775-787.
169. Salazar, A. I., F. Palomeque, E. Pascual and V. Porras (2006). "Disgerminoma y síndrome de Swyer." *Progresos de Obstetricia y Ginecología* **49**(3): 154-158.
170. Salerno, D. M., J. S. Tront, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2012). "Gadd45a and Gadd45b modulate innate immune functions of granulocytes and macrophages by differential regulation of p38 and JNK signaling." *J Cell Physiol* **227**(11): 3613-3620.
171. Salvador, J. M., J. D. Brown-Clay and A. J. Fornace, Jr. (2013). "Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis." *Adv Exp Med Biol* **793**: 1-19.
172. Salvador, J. M., M. C. Hollander, A. T. Nguyen, J. B. Kopp, L. Barisoni, J. K. Moore, J. D. Ashwell and A. J. Fornace, Jr. (2002). "Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome." *Immunity* **16**(4): 499-508.

173. Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, G. I. Belova, A. J. Fornace, Jr. and J. D. Ashwell (2005). "The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway." *Nature Immunology* **6**(4): 396-402.
174. Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T. D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A. J. Fornace, Jr. and J. D. Ashwell (2005). "Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases." *Nat Immunol* **6**(4): 390-395.
175. Sanchez, R., D. Pantoja-Uceda, D. Torres, J. Prieto, R. Campos-Olivas and F. J. Blanco (2008). "NMR assignment and secondary structure of human growth arrest and DNA damage alpha protein (Gadd45 alpha)." *Biomolecular NMR assignments* **2**(2): 139-142.
176. Sancho, D., M. Gomez and F. Sanchez-Madrid (2005). "CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation." *Trends Immunol* **26**(3): 136-140.
177. Saylam, K. and P. Simon (2003). "WT1 gene mutation responsible for male sex reversal and renal failure: the Frasier syndrome." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **110**(1): 111-113.
178. Schmahl, J., E. M. Eicher, L. L. Washburn and B. Capel (2000). "Sry induces cell proliferation in the mouse gonad." *Development* **127**(1): 65-73.
179. Schmidt, D., C. E. Ovitt, K. Anlag, S. Fehsenfeld, L. Gredsted, A. C. Treier and M. Treier (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." *Development* **131**(4): 933-942.
180. Schmitz, I. (2013). "Gadd45 proteins in immunity." *Adv Exp Med Biol* **793**: 51-68.
181. Schmitz, I., L. K. Clayton and E. L. Reinherz (2003). "Gene expression analysis of thymocyte selection in vivo." *Int Immunol* **15**(10): 1237-1248.
182. Schrag, J. D., S. Jiralerspong, M. Banville, M. L. Jaramillo and M. D. O'Connor-McCourt (2008). "The crystal structure and dimerization interface of GADD45." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(18): 6566-6571.
183. Sekido, R., I. Bar, V. Narvaez, G. Penny and R. Lovell-Badge (2004). "SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors." *Dev Biol* **274**(2): 271-279.
184. Sekido, R. and R. Lovell-Badge (2008). "Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer." *Nature* **453**(7197): 930-934.
185. Sekido, R. and R. Lovell-Badge (2009). "Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge?" *Trends in Genetics* **25**(1): 19-29.
186. Shen, J. H. and H. A. Ingraham (2002). "Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins." *Mol Endocrinol* **16**(3): 529-540.
187. Shin, G. T., H. J. Lee and H. Kim (2012). "GADD45gamma regulates TNF-alpha and IL-6 synthesis in THP-1 cells." *Inflamm Res* **61**(11): 1195-1202.
188. Siggers, P., G. A. Carre, D. Bogani, N. Warr, S. Wells, H. Hilton, C. Esapa, M. K. Hajihosseini and A. Greenfield (2014). "A Novel Mouse Fgfr2 Mutant, Hobbyhorse (hob), Exhibits Complete XY Gonadal Sex Reversal." *PLoS One* **9**(6): e100447.
189. Smith, M. L., I. T. Chen, Q. Zhan, I. Bae, C. Y. Chen, T. M. Gilmer, M. B. Kastan, P. M. O'Connor and A. J. Fornace, Jr. (1994). "Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen." *Science* **266**(5189): 1376-1380.
190. Sokol, C. L., N. Q. Chu, S. Yu, S. A. Nish, T. M. Laufer and R. Medzhitov (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." *Nat Immunol* **10**(7): 713-720.
191. Sudbeck, P., M. L. Schmitz, P. A. Baeuerle and G. Scherer (1996). "Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9." *Nat Genet* **13**(2): 230-232.
192. Sugawara, T., T. Moriguchi, E. Nishida and Y. Takahama (1998). "Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes." *Immunity* **9**(4): 565-574.
193. Sultan, C., A. Biason-Lauber and P. Philibert (2009). "Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: recent clinical and genetic findings." *Gynecol Endocrinol* **25**(1): 8-11.
194. Suzuki, M., T. K. Watanabe, T. Fujiwara, Y. Nakamura, E. Takahashi and A. Tanigami (1999). "Molecular cloning, expression, and mapping of a novel human cDNA, GRP17, highly homologous to human gadd45 and murine MyD118." *J Hum Genet* **44**(5): 300-303.
195. Svensson, C. I., T. Inoue, D. Hammaker, A. Fukushima, S. Papa, G. Franzoso, G. Schett, M. Corr, D. L. Boyle and G. S. Firestein (2009). "Gadd45beta deficiency in rheumatoid arthritis: enhanced synovitis through JNK signaling." *Arthritis Rheum* **60**(11): 3229-3240.
196. Swain, A. and R. Lovell-Badge (1999). "Mammalian sex determination: a molecular drama." *Genes Dev* **13**(7): 755-767.

197. Takekawa, M. and H. Saito (1998). "A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK." *Cell* **95**(4): 521-530.
198. Takeeto, T., C.-H. Lee, J. Zhang, Y. Li, C.-Y. G. Lee and Y.-F. C. Lau (2005). "Expression of SRY proteins in both normal and sex-reversed XY fetal mouse gonads." *Developmental Dynamics* **233**(2): 612-622.
199. Tevosian, S. G., K. H. Albrecht, J. D. Crispino, Y. Fujiwara, E. M. Eicher and S. H. Orkin (2002). "Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2." *Development* **129**(19): 4627-4634.
200. Thalheimer, F. B., S. Wingert, P. De Giacomo, N. Haetscher, M. Rehage, B. Brill, F. J. Theis, L. Hennighausen, T. Schroeder and M. A. Rieger (2014). "Cytokine-Regulated GADD45G Induces Differentiation and Lineage Selection in Hematopoietic Stem Cells." *Stem Cell Reports* **3**(1): 34-43.
201. Tilmann, C. and B. Capel (1999). "Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad." *Development* **126**(13): 2883-2890.
202. Tornatore, L., D. Marasco, N. Dathan, R. M. Vitale, E. Benedetti, S. Papa, G. Franzoso, M. Ruvo and S. M. Monti (2008). "Gadd45 beta forms a homodimeric complex that binds tightly to MKK7." *Journal of molecular biology* **378**(1): 97-111.
203. Trinchieri, G., S. Pflanz and R. A. Kastelein (2003). "The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses." *Immunity* **19**(5): 641-644.
204. Uda, M., C. Ottolenghi, L. Crisponi, J. E. Garcia, M. Deiana, W. Kimber, A. Forabosco, A. Cao, D. Schlessinger and G. Pilia (2004). "Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development." *Hum Mol Genet* **13**(11): 1171-1181.
205. Uhlenhaut, N. H., S. Jakob, K. Anlag, T. Eisenberger, R. Sekido, J. Kress, A. C. Treier, C. Klugmann, C. Klasen, N. I. Holter, D. Riethmacher, G. Schutz, A. J. Cooney, R. Lovell-Badge and M. Treier (2009). "Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation." *Cell* **139**(6): 1130-1142.
206. Vainio, S., M. Heikkila, A. Kispert, N. Chin and A. P. McMahon (1999). "Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling." *Nature* **397**(6718): 405-409.
207. Vairapandi, M., N. Azam, A. G. Balliet, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2000). "Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control." *J Biol Chem* **275**(22): 16810-16819.
208. Vairapandi, M., A. G. Balliet, A. J. Fornace, Jr., B. Hoffman and D. A. Liebermann (1996). "The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1." *Oncogene* **12**(12): 2579-2594.
209. Vairapandi, M., A. G. Balliet, B. Hoffman and D. A. Liebermann (2002). "GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress." *J Cell Physiol* **192**(3): 327-338.
210. Wagner, T., J. Wirth, J. Meyer, B. Zabel, M. Held, J. Zimmer, J. Pasantes, F. D. Bricarelli, J. Keutel, E. Hustert, U. Wolf, N. Tommerup, W. Schempp and G. Scherer (1994). "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9." *Cell* **79**(6): 1111-1120.
211. Wainwright, E. N. and D. Wilhelm (2010). "The game plan: cellular and molecular mechanisms of mammalian testis development." *Curr Top Dev Biol* **90**: 231-262.
212. Wang, X., M. Gorospe and N. J. Holbrook (1999). "gadd45 is not required for activation of c-Jun N-terminal kinase or p38 during acute stress." *J Biol Chem* **274**(42): 29599-29602.
213. Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, Jr. and C. C. Harris (1999). "GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3706-3711.
214. Warr, N., G. A. Carre, P. Siggers, J. V. Faleato, R. Brixey, M. Pope, D. Bogani, M. Childers, S. Wells, C. L. Scudamore, M. Tedesco, I. del Barco Barrantes, A. R. Nebreda, P. A. Trainor and A. Greenfield (2012). "Gadd45gamma and Map3k4 interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression." *Developmental cell* **23**(5): 1020-1031.
215. Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-688.
216. Wilhelm, D., R. Hiramatsu, H. Mizusaki, L. Widjaja, A. N. Combes, Y. Kanai and P. Koopman (2007). "SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development." *J Biol Chem* **282**(14): 10553-10560.

217. Wilhelm, D., F. Martinson, S. Bradford, M. J. Wilson, A. N. Combes, A. Beverdam, J. Bowles, H. Mizusaki and P. Koopman (2005). "Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination." *Dev Biol* **287**(1): 111-124.
218. Wilhelm, D., S. Palmer and P. Koopman (2007). "Sex determination and gonadal development in mammals." *Physiol Rev* **87**(1): 1-28.
219. Wilhelm D, P. S. a. K. P. (2007). "Sex Determination and Gonadal Development in Mammals." *Physiol Rev*.
220. Wilkie, A. O., F. M. Campbell, P. Daubeney, D. B. Grant, R. J. Daniels, M. Mullarkey, N. A. Affara, M. Fitchett and S. M. Huson (1993). "Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review." *Am J Med Genet* **46**(5): 597-600.
221. Wilson, M. J., P. Jeyasuria, K. L. Parker and P. Koopman (2005). "The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of Vanin-1 during mouse testis development." *J Biol Chem* **280**(7): 5917-5923.
222. Yang, J., H. Zhu, T. L. Murphy, W. Ouyang and K. M. Murphy (2001). "IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production." *Nature Immunology* **2**(2): 157-164.
223. Yang, Q., G. Li, Y. Zhu, L. Liu, E. Chen, H. Turnquist, X. Zhang, O. J. Finn, X. Chen and B. Lu (2011). "IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells." *Eur J Immunol* **41**(11): 3351-3360.
224. Yi, Y. W., D. Kim, N. Jung, S. S. Hong, H. S. Lee and I. Bae (2000). "Gadd45 family proteins are coactivators of nuclear hormone receptors." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**(1): 193-198.
225. Ying, J., G. Srivastava, W. S. Hsieh, Z. Gao, P. Murray, S. K. Liao, R. Ambinder and Q. Tao (2005). "The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors." *Clin Cancer Res* **11**(18): 6442-6449.
226. Zazzeroni, F., S. Papa, A. Algeciras-Schimmich, K. Alvarez, T. Melis, C. Bubici, N. Majewski, N. Hay, E. De Smaele, M. E. Peter and G. Franzoso (2003). "Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis." *Blood* **102**(9): 3270-3279.
227. Zhan, Q., M. J. Antinore, X. W. Wang, F. Carrier, M. L. Smith, C. C. Harris and A. J. Fornace, Jr. (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." *Oncogene* **18**(18): 2892-2900.
228. Zhan, Q., K. A. Lord, I. Alamo, Jr., M. C. Hollander, F. Carrier, D. Ron, K. W. Kohn, B. Hoffman, D. A. Liebermann and A. J. Fornace, Jr. (1994). "The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth." *Mol Cell Biol* **14**(4): 2361-2371.
229. Zhang, J., K. V. Salojin, J. X. Gao, M. J. Cameron, I. Bergerot and T. L. Delovitch (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells." *J Immunol* **162**(7): 3819-3829.
230. Zhang, N., M. H. Ahsan, L. Zhu, L. C. Sambucetti, A. F. Purchio and D. B. West (2005). "NF-kappaB and not the MAPK signaling pathway regulates GADD45beta expression during acute inflammation." *J Biol Chem* **280**(22): 21400-21408.
231. Zhang, W., I. Bae, K. Krishnaraju, N. Azam, W. Fan, K. Smith, B. Hoffman and D. A. Liebermann (1999). "CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control." *Oncogene* **18**(35): 4899-4907.
232. Zhang, W., T. Li, Y. Shao, C. Zhang, Q. Wu, H. Yang, J. Zhang, M. Guan, B. Yu and J. Wan (2010). "Semi-quantitative detection of GADD45-gamma methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis." *J Cancer Res Clin Oncol* **136**(8): 1267-1273.
233. Zhang, X., H. Sun, D. C. Danila, S. R. Johnson, Y. Zhou, B. Swearingen and A. Klibanski (2002). "Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(3): 1262-1267.
234. Zhu, J., X. Liu, H. Jin and X. Lu (2011). "Swyer syndrome, 46,XY gonadal dysgenesis, a sex reversal disorder with dysgerminoma: a case report and literature review." *Clin Exp Obstet Gynecol* **38**(4): 414-418.
235. Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* **112**(5): 1557-1569.

236. Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* **28**: 445-489.

“No hay ninguna vida que sea nuestra por completo, ningún camino cierto. Que al final casi nada importa. Que cuando nos sentamos frente al abismo y miramos hacia atrás sólo se percibe entre las sombras el amor recibido de quien nos quiso de verdad. Que cualquier camino es bueno si sirve para preservar ese sentimiento absoluto, el único por el que merece la pena vivir y morir”

Andrés Pascual, El guardián de la flor de loto.